

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 11 月 11 日 (11.11.2004)

PCT

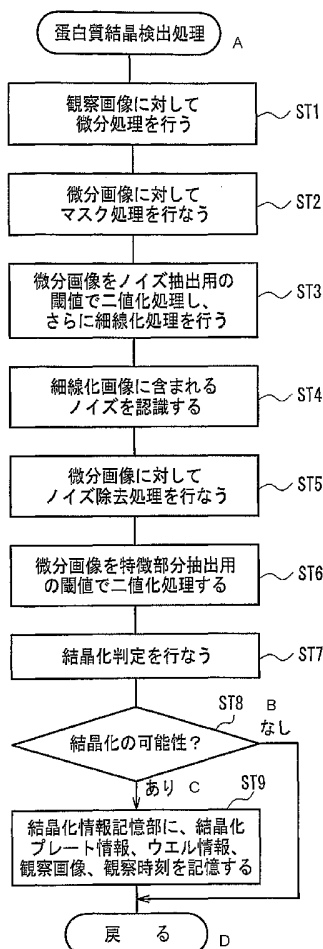
(10) 国際公開番号
WO 2004/097366 A2

- (51) 国際特許分類: G01N
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006160
(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 28 日 (28.04.2004)
(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2003-123984 2003 年 4 月 28 日 (28.04.2003) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5718501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松崎 浩文 (MATSUZAKI, Hirofumi). 宮武 秀行 (MIYATAKE, Hideyuki). 金 成勲 (KIM, Seong Hoon). 三木 邦夫 (MIKI, Kunio).
(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PROTEIN CRYSTAL, APPARATUS FOR DETECTING PROTEIN CRYSTAL AND PROGRAM FOR DETECTING PROTEIN CRYSTAL

(54) 発明の名称: 蛋白質結晶検出方法および蛋白質結晶検出装置ならびに蛋白質結晶検出プログラム



A...PROTEIN CRYSTAL DETECTION
B...NO
C...YES
D...RETURNING
ST1...DIFFERENTIATING OBSERVATION IMAGE
ST2...MASKING DIFFERENTIAL IMAGE
ST3...BINARIZING DIFFERENTIAL IMAGE WITH THRESHOLD FOR REMOVING NOISES FOLLOWED BY LINE THINNING
ST4...RECOGNIZING NOISES IN LINE-THINNED IMAGE
ST5...REMOVING NOISES FROM DIFFERENTIAL IMAGE
ST6...BINARIZING DIFFERENTIAL IMAGE WITH THRESHOLD FOR EXTRACTING CHARACTERIZING PORTION
ST7...JUDGING CRYSTALLIZATION
ST8...POSSIBILITY OF CRYSTALLIZATION?
ST9...MEMORIZING CRYSTALLIZATION PLATE DATA, WELL DATA, OBSERVATION IMAGE AND OBSERVATION TIME IN CRYSTALLIZATION DATA MEMORY UNIT

(57) Abstract: It is intended to provide a method for detecting protein crystals, an apparatus for detecting protein crystals and a program for detecting protein crystals by which protein crystals can be efficiently detected at a high reliability. To detect protein crystals, an image obtained by observing a protein solution under crystallization by the vapor diffusion method is differentiated to give a differential image having luminance change data that indicate the extent of luminance changes. After removing noises, the differential image is binarized based on the threshold for extracting a characterizing portion to give a binarized image in which a portion showing a large luminance change remains as the characterizing portion. From this characterizing portion of the binarized image, the presence or absence of protein crystals is judged, thereby judging the occurrence of crystallization. Thus, protein crystal detection, which has been carried out depending exclusively on observation with the naked eye of skilled workers, can be efficiently carried out at a high reliability.

/ 続葉有 /



(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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:

— 国際調査報告書なし ; 報告書を受け取り次第公開される。

(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,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、蛋白質結晶検出を効率よく高い信頼性で行うことができる蛋白質結晶検出方法および蛋白質結晶検出装置ならびに蛋白質結晶検出プログラムを提供することを目的とする。

本発明の蛋白質結晶検出は、まず蒸気拡散法による結晶化中の蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する。次いでこの微分画像からノイズを除去した後に、特徴部抽出用の閾値で二値化することにより大きな輝度変化を示す部分を特徴部分として残した二値化画像を求める。そしてこの二値化画像の特徴部分から蛋白質結晶の有無を判断する結晶化判定を行う。これにより、従来は専ら観察担当者の目視観察に依存していた蛋白質結晶の検出を効率よく高い信頼性で行うことができる。

明 細 書

蛋白質結晶検出方法および蛋白質結晶検出装置ならびに蛋白質結晶検出プログラム

5 技術分野

本発明は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法および蛋白質結晶検出装置ならびに蛋白質結晶検出プログラムに関する。

10 背景技術

近年遺伝子情報を医療などの分野に有効に利用するための取り組みが活発化しており、その基礎技術として、遺伝子の発現の結果得られる蛋白質の構造を解析する努力が行われている。この蛋白質の構造解析とは、蛋白質の3次元立体構造を特定するものであり、X線回析などの方法によって行われる。

このようなX線回析により、蛋白質の構造解析を行うためには、まず解析対象の蛋白質を結晶化することが求められ、この蛋白質結晶化の方法として蒸気拡散法が知られている。この方法では、結晶化対象の蛋白質を含む蛋白質溶液から蒸発する溶媒成分を同一容器内に収容された結晶化溶液によって吸収させることにより、蛋白質溶液を過飽和状態に保って結晶を徐々に生成させる。従来より、この蒸気拡散法を用いて蛋白質の結晶化を行うための専用の容器や装置が提案されている（例えば、特開2002-233702号公報および特開2002-179500号公報参照）。

しかしながら、現状では結晶化を促進させるための結晶生育条件を理論的に特定することができず、各種の条件を変えながら多数の試験を系統的に実行した結果から最良の条件を求めるスクリーニングの手法を用いざるを得ない。このため、従来より対象となる蛋白質溶液を各種の結晶生育条件、すなわち前述の結晶化溶液の種類・濃度や生育温度を変化させた幾通りもの条件下で、試験を反復実行する必要があった。

このような試験は、蛋白質溶液および結晶化溶液を収容した結晶化用のマイクロプレートなどの結晶化容器を特定温度に設定された恒温室内に保管し、結晶化の有無や進行度合いを時間経過に伴って観察することによって行われていた。そして蛋白質結晶検出のための観察作業は従来は専ら人手に依存しており、試験担当者が恒温室から結晶化容器を取り出して顕微鏡視野内で蛋白質溶液を目視観察することによって、結晶化の進行状況をデータ化し記録する作業を行っていた。

15 発明の開示

ところがこのような観察作業は、蛋白質溶液中の微細な結晶を目視で判断しながら検出する作業であることから、効率よく正確な蛋白質結晶を検出することが困難であった。例えば、蛋白質溶液を撮り込んだ観察画像中には、検出目的である蛋白質結晶以外にも、沈殿物などの固形異物や結晶化容器の形状に由来する陰影部、液滴の輪郭などのノイズ部分が存在しており、これらのノイズ部分と検出対象との識別は、専ら試験担当者の熟練や勘に依存していた。このため、試験担当者の個人差による作業効率や信頼性のばらつきが避けられず、従来の結晶検出作業の作業効率や検出結果の信頼性は必ずしも満足のゆくものではなかった。

25

そこで本発明は、蛋白質結晶検出を効率よく高い信頼性で行うことが

できる蛋白質結晶検出方法および蛋白質結晶検出装置ならびに蛋白質結晶検出プログラムを提供することを目的とする。

前記目的を達成するために、蛋白質結晶を検出する本発明の蛋白質結晶検出方法は、蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理工程と、前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す部分を特徴部分として残した二値化画像を得る二値化処理工程と、前記二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定工程とを含むことを特徴とする。

また、前記目的を達成するために、蛋白質結晶を検出する本発明の蛋白質結晶検出装置は、蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を記憶する観察画像記憶部と、前記観察画像記憶部の観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理部と、前記微分処理部で生成された前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る二値化処理部と、前記二値化処理部で得られた二値化画像を記憶する二値化画像記憶部と、前記二値化画像記憶部の二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定部とを備えたことを特徴とする。

さらにまた、前記目的を達成するために、蛋白質溶液内で生成した蛋白質結晶を検出する処理をコンピュータに実行させる本発明の蛋白質結晶検出プログラムは、前記蛋白質結晶の検出処理が、蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示

す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理工程と、前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る二値化処理工程と、前記二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定工程とを含むことを特徴とする。

従来は専ら観察担当者の目視観察に依存していたが、本発明によれば、蛋白質結晶の検出を自動化でき、かつ、効率よく高い信頼性で行うことができる。また、本発明の蛋白質結晶検出方法は、例えば、蒸気拡散法等による蛋白質結晶化条件のスクリーニング方法に使用でき、本発明の蛋白質結晶検出装置は、例えば、蒸気拡散法等による蛋白質結晶化条件のスクリーニング装置や蛋白質結晶の製造装置に使用できる。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出装置の斜視図である。

図 2 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの斜視図である。

図 3 および図 5 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法において使用される結晶化プレートの部分断面図である。

図 4 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出装置の観察部の部分断面図である。

図 6 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を示すブロック図である。

図 7 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出装置の処理機構を示す機能ブロック図である。

図 8 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法を示すフロー図である。

図 9 A および B は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法において使用される結晶化プレートの部分断面図である。

5 図 10 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における観察画像を示す図である。

図 11 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における微分画像を示す図である。

10 図 12 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における微分画像（マスク処理）を示す図である。

図 13 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における細線化画像を示す図である。

図 14 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における微分画像（ノイズ除去）を示す図である。

15 図 15 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法における二値化画像を示す図である。

図 16 A および B は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法におけるノイズ認識処理の説明図である。

20 図 17 は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法におけるノイズ認識処理の説明図である。

図 18 A および B は、本発明の一実施形態の蛋白質結晶検出方法におけるノイズ認識処理の説明図である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の蛋白質結晶検出方法は、さらに、結晶化対象の蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由来する輝度変化情報および特徴部分の少な

くとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方から除去する容器ノイズ除去工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法において、前記容器ノイズ除去工程は、
5 予め教示されている情報に基づいて所定領域の輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去することが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法は、さらに、前記微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後に細線化処理することにより、複数の線からなる細線化画像を得る細線化画像生成工程と、前記細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出
10 するノイズ認識工程と、前記ノイズ認識工程でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方から除去するノイズ除去工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法において、前記ノイズ認識工程は、線の
15 長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなす工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法において、前記ノイズ認識工程は、線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線
20 性が予め決定した値より高い線をノイズとみなす工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法において、前記ノイズ認識工程は、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線をノ
25 イズとみなす工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出方法は、さらに、結晶化容器に保持された蛋

白質溶液の画像をカメラで撮り込む観察工程と、前記カメラで撮り込んだ観察画像を観察画像記憶部に記憶する記憶工程とを含み、前記微分処理工程は、前記観察画像記憶部に記憶した画像に対して行うことが好ましい。

- 5 また、本発明の蛋白質結晶検出方法は、蛋白質結晶化条件のスクリーニング方法における発生した蛋白質結晶検出の方法として使用することができる。なお、前記スクリーニング方法は、本発明の検出方法を利用する以外については、特に制限されず、従来公知の技術を利用できる。
- 10 次に、本発明の蛋白質結晶検出装置は、さらに、蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由来する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を、前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方から除去する容器ノイズ除去部を備えることが好ましい。
- 15 本発明の蛋白質結晶検出装置は、さらに、マスク情報を記憶するマスク情報記憶部を備え、前記容器ノイズ除去部は、前記マスク情報に基づいて前記輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方から除去することが好ましい。
- 20 本発明の蛋白質結晶検出装置は、さらに、前記微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後に細線化処理することにより複数の線からなる細線化画像を得る細線化画像生成部と、前記細線化画像生成部で生成された細線化画像を記憶する細線化画像記憶部と、前記細線化画像記憶部の細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することによりノイズとみなす線を検出するノイズ認識処理部と、前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方か
- 25

ら前記ノイズ検出処理部によってノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去するノイズ除去処理部を備えることが好ましい。

5 本発明の蛋白質結晶検出装置において、前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなすことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出装置において、前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線性が予め決定した値より高い線をノイズとみなすことが好ましい。

10 本発明の蛋白質結晶検出装置において、前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線をノイズとみなすことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出装置は、さらに、結晶化対象の蛋白質溶液を保持する結晶化容器がセットされる観察ステージと、前記観察ステージにセットされた結晶化容器の蛋白質溶液を撮像して画像を撮り込むカメラとを備え、前記カメラで撮り込んだ蛋白質溶液の画像を前記観察画像記憶部に記憶することが好ましい。

15

また、本発明の蛋白質結晶検出装置は、蛋白質結晶化条件のスクリーニング装置における発生した蛋白質結晶の検出に使用することができる。

20

さらにまた、本発明の蛋白質結晶検出装置は、蛋白質結晶の製造装置における蛋白質結晶のモニターや検出に使用することができる。なお、前記スクリーニング装置および結晶製造装置は、本発明の検出装置を利用する以外については、特に制限されず、従来公知の技術を利用できる。

25

次に、本発明の蛋白質結晶検出プログラムは、前記タンパク質結晶の

検出処理が、さらに、結晶化対象の蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由来する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方から除去する容器ノイズ除去工程を含むことが好ましい。

- 5 本発明の蛋白質結晶検出プログラムにおいて、前記ノイズ除去工程は、予め教示されている情報に基づいて所定領域の輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去することが好ましい。

- 本発明の蛋白質結晶検出プログラムは、前記タンパク質結晶の検出処理が、さらに、前記微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後に細
10 線化処理することにより複数の線からなる細線化画像を得る細線化画像生成工程と、前記細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出するノイズ認識工程と、前記ノイズ検出工程でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画
15 像の少なくとも一方より除去するノイズ除去工程を含むことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出プログラムにおいて、前記ノイズ認識工程は、線の長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなすことが好ましい。

- 本発明の蛋白質結晶検出プログラムにおいて、前記ノイズ認識工程は、
20 線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線性が予め決定した値より高い線をノイズとみなすことが好ましい。

- 本発明の蛋白質結晶検出プログラムにおいて、前記ノイズ認識工程は、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線
25 をノイズとみなすことが好ましい。

本発明の蛋白質結晶検出プログラムは、前記タンパク質結晶の検出処

理が、さらに、結晶化容器に保持された蛋白質溶液を観察してカメラにより観察画像を撮り込む観察工程と、前記カメラで撮り込んだ観察画像を観察画像記憶部に記憶する記憶工程とを含み、前記微分処理工程は、前記観察画像記憶部に記憶した画像に対して行うことが好ましい。

5

次に本発明の実施の形態の一例を図面を参照して説明する。

まず、蛋白質結晶検出装置の全体構造の一例を、図1を参照して説明する。蛋白質結晶検出装置1は、例えば、蒸気拡散法等により蛋白質溶液内に生成した蛋白質結晶を検出するための観察に使用される専用の観察装置である。図1において、基台2上には、観察部3、ディスプレイ装置8および操作入力用のキーボード9が配設されている。

観察部3は、フレーム3aに観察ステージ4を水平姿勢で装着し、観察ステージ4の上方にカメラ7を配置した構成となっている。観察ステージ4には結晶化用のマイクロプレート6（以下、単に「結晶化プレート6」と略記する）がセットされている。結晶化プレート6は、蛋白質溶液中の蛋白質を結晶化させるために用いられる結晶化容器である。観察ステージ4に備えられたXYZ移動機構を駆動することにより、結晶化プレート6はX、Y、Z方向に移動する。

図2、図3を参照して、結晶化プレート6の一例について説明する。図2に示すように、結晶化プレート6には複数のウェル6aが格子状に形成されている。ウェル6aは、円形の凹部の中心に円柱状の液保持部6bが設けられたいわゆるカルデラ状の液体収納用の凹部であり、ウェル6a内には、結晶化の対象となる試料、すなわち結晶化対象の蛋白質を含んだ蛋白質溶液13と、結晶化に用いられる結晶化溶液12とが分注される。前記結晶化プレート6の大きさは、特に制限されないが、例

例えば、規格化されたサイズのものを使用できる。前記規格としては、例えば、SBS規格等があげられる。前記ウェル6aの大きさは、特に制限されないが、例えば、直径10mm～20mmであり、前記液保持部6bの大きさは、特に制限されないが、例えば、前記ウェル6aの半分の直径の大きさである。

図3はこれらの試料を収容した1つのウェル6aの断面の一例を示している。ウェル6a内では、液保持部6bの頂部に設けられたポケット内に液滴状の蛋白質溶液13が載置状態で保持されており、液保持部6bを囲むリング状の貯液部6cには、結晶化溶液12が貯溜されている。

10 ウェル6aは、結晶化の対象となる蛋白質溶液を載置状態で下方から保持する液保持部6bと結晶化溶液12を貯溜する貯液部6cとを有する液体収容部となっている。後述するように結晶化の開始に際しては、液保持部6bに保持された蛋白質溶液13に所定量の結晶化溶液12を貯液部6cから取り出して分注して混合した後、各ウェル6a上面に密封

15 用のシール14が貼着される（例えば、図2参照）。

この状態の結晶化プレート6を所定の温度雰囲気下で保管することにより、蛋白質溶液13中の溶媒成分を蒸発させ、これにより蛋白質溶液13の蛋白質濃度を過飽和状態にまで高めて蛋白質結晶を生成する。このとき、蛋白質溶液13から蒸発する溶媒と結晶化溶液12に吸収される蒸気とが平衡状態を保ちながら蛋白質溶液13からの溶媒の蒸発が緩やかに進行することにより、安定した結晶生成が行われる。

20

図1の観察部3はこのような結晶生成過程の結晶化プレート6を観察することにより、各ウェル6aにおける蛋白質結晶の有無や結晶化の度合いを検出する。すなわち、図4に示すように、例えば、観察ステージ

25 4にセットされた結晶化プレート6をカメラ7の下方に移動させ、観察対象のウェル6a内の液保持部6bをカメラ7の撮像光軸に位置合わせ

する。そして下方の照明装置 5 から照明光を照射した状態で、カメラ 7 によって結晶化プレート 6 を撮像することにより、結晶化プレート 6 に保持された蛋白質溶液の観察画像が撮り込まれる(例えば、図 10 参照)。

5 なお、図 2, 図 3 は、結晶生成過程において蛋白質溶液 1 3 を載置状態で下方から支持するシッティングドロップ法を用いた蒸気拡散法において用いられる結晶化プレート 6 の一例を示しているが、これ以外にも、例えば、図 5 に示すようなウェル形状の結晶化プレート 6 0 を使用してもよい。この結晶化プレート 6 0 は、蛋白質溶液 1 3 の液滴を垂下状態で保持するハンギングドロップ法において用いられる。

10 図 5 に示す例では、ウェル 6 0 A は結晶化溶液 1 2 を貯溜する貯液部を有するのみで液保持部は形成されておらず、結晶化対象の蛋白質溶液 1 3 の液滴(所定量の結晶化溶液 1 2 が混合されたもの)は、ウェル 6 0 a を閉塞するガラス板 1 4 A の裏面に垂下状態で保持される。すなわち蛋白質溶液 1 3 が滴下されたガラス板 1 4 A を反転して、結晶化溶液
15 1 2 が分注されたウェル 6 0 A を塞ぐように貼着してウェル 6 0 A を密封する。

次に、蛋白質結晶検出装置の制御系の構成の一例を図 6 を参照して、説明する。図 6 において、処理部 2 0 は、データ記憶部 2 1 に記憶された各種データに基づいて、プログラム記憶部 2 2 に記憶された各種処理
20 プログラムを実行することにより、後述する各種動作および処理機能を実現する。ここでは、プログラム記憶部 2 2 には、結晶検出プログラム 2 2 a、観察動作プログラム 2 2 b が記憶されており、これらのプログラムを実行することにより、後述する蛋白質溶液の観察動作および蛋白質
25 溶液中の蛋白質結晶検出処理が行われる。

データ記憶部 2 1 は、処理画像記憶部 2 1 a、観察画像記憶部 2 1 b、

結晶化情報記憶部 2 1 c を備えており、処理画像記憶部 2 1 a は、蛋白質結晶検出処理において各種の処理が行われた後の処理画像を記憶する。観察画像記憶部 2 1 b は、カメラ 7 によって撮り込まれた蛋白質溶液 1 3 の観察画像を記憶する（例えば、図 1 0 参照）。

- 5 後述する蛋白質結晶検出処理においては、観察画像記憶部 2 1 b に記憶された観察画像が処理対象となる。結晶化情報記憶部 2 1 c は、結晶化情報、すなわち蛋白質結晶検出処理において結晶化が検出された観察画像の画像データや、観察画像が取得されたプレート・ウェルを特定する情報および当該プレートを観察した観察時刻などの情報を記憶する。
- 10 また処理部 2 0 には、表示処理部 2 3、操作・入力処理部 2 4、カメラ 7、照明装置 5、観察ステージ 4 が接続されている。観察動作において、処理部 2 0 が観察ステージ 4、照明装置 5、カメラ 7 を制御することにより、観察ステージ 4 に保持された結晶化プレート 6 の移動、照明装置 5 による結晶化プレート 6 の照明、カメラ 7 による蛋白質溶液の画像の撮り込みが実行される。表示処理部 2 3 は、カメラ 7 によって撮り込まれた観察画像や各種の処理画像を表示するほか、データ入力時の案内画像などを表示ディスプレイ装置 8 に表示させる処理を行う。操作・入力処理部 2 4 は、キーボード 9 等の入力装置を操作することにより、処理部 2 0 に対して操作指令やデータ入力を行う。

20

- 次に、蛋白質結晶検出処理機能の一例について、図 7 の機能ブロック図を参照して説明する。同図において、微分処理部 3 0 は、観察画像記憶部 2 1 b に記憶されている観察画像（例えば、図 1 0 参照）、すなわちカメラ 7 によって撮り込まれた蛋白質溶液の画像を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報から成る微分画像を生成する（例えば、図 1 1 参照）。
- 25

ここで輝度変化情報とは、観察画像を構成する各画素における輝度の変化率を数値（輝度変化値）で示すものである。

観察画像中では、背景領域や照明光が透過した部分など観察対象が存在しない領域では輝度変化は小さく、検出対象の蛋白質結晶の輪郭に該当する部分では輝度変化は大きい。したがって上述の微分画像においては、画像に撮り込まれた観察対象物の輪郭が輝度変化の大きい部分として抽出される。

但し、この微分画像においては、検出目標である蛋白質結晶のみならず、蛋白質溶液内に存在する結晶以外の沈殿物などの固形異物や、ウェル 6 a 内の液保持部 6 b の形状や液滴の輪郭なども同様に輝度変化の大きい部分として抽出されるため、これらの検出目標以外の輝度変化の大きい部分をノイズとして除去するノイズ除去処理(後述)が行われる。

図 7 の微分画像記憶部 3 1 は、微分処理部 3 0 で生成された微分画像を記憶する。二値化処理部 3 2 は、微分画像記憶部 3 1 の微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより、輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る（例えば、図 1 5 参照）。そして二値化画像記憶部 3 3 は、二値化処理部 3 2 で得られた二値化画像を記憶する。結晶化判定部 3 4 は、二値化画像記憶部 3 3 に記憶された二値化画像の特徴部分より、蛋白質結晶の有無を判断する。なお、前記特徴部抽出用の閾値の設定方法は、特に制限されないが、例えば、予め準備した結晶のサンプルや画像サンプル等を用いて、検出目標の結晶の特徴部が抽出可能な値に適宜設定する方法等があげられる。

ここで、二値化処理部 3 2 による二値化処理の対象となる微分画像には、以下に説明するマスク処理、ノイズ除去処理が実行される。そして除去の対象となるノイズを認識することを目的として、ノイズ除去処理

に先立ってノイズ抽出用の二値化処理および細線化処理が実行される。

まずマスク処理について説明する。マスク情報記憶部 3 6 は、マスク情報、すなわち観察画像内において蛋白質溶液を保持する結晶化容器である結晶化プレート 6 の形状（液保持部 6 b の形状、例えば、図 2 およ
5 び 3 参照）に由来して微分画像に現れる輝度変化情報、すなわち本来観察対象とする蛋白質溶液の観察画像中に含まれるノイズのうち、容器である結晶化プレート 6 の形状に由来して現れる容器ノイズを微分画像から除去するためのマスク情報（ここでは、液保持部 6 b に設けられたポケットの径寸法）を記憶する。マスク処理部 3 5 は、マスク情報記憶部
10 3 6 に記憶されたマスク情報に基づき、微分画像から容器ノイズを除去するマスク処理を行う。これにより、容器ノイズが除去された微分画像が得られる（例えば、図 1 2 参照）。

次にノイズ除去処理について説明する。ここで行われるノイズ除去処理は、上述のマスク処理では除去できないノイズ、例えば液保持部 6 b
15 頂部のポケット内に現れる蛋白質溶液の液滴の輪郭など、予め教示することができないノイズを対象としたものである。このため、ここでは微分画像中の情報からどの部分がノイズであるかをノイズ認識処理部 3 8 によって認識し、このノイズ認識結果に基づきノイズ除去処理部 3 7 が微分画像中のノイズ除去を行う。これにより、ノイズが除去された微分
20 画像が得られる（例えば、図 1 4 参照）。

ここでは、ノイズ認識の手法として、微分画像を細線化した細線化画像中の線の形状的特徴に基づき、これらの線が蛋白質結晶を示す図形の輪郭などの形状を示す形状線であるか、もしくは液滴の輪郭など明らかに蛋白質結晶を示す図形とは異なる線であるかを識別するようにしてい
25 る。

すなわちここに示すノイズ認識においては、まず二値化処理部 3 9 に

より、微分画像記憶部 31 に記憶された微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理する。そして細線化処理部 40 は、二値化処理された二値化画像を細線化処理する。すなわち、二値化画像中の各線要素を 1 画素幅の細い線に置き換える。これにより、微分画像中の輝度変化が大きい部分を示す範囲が細線化された複数の線から成る細線化画像が生成される（例えば、図 13 参照）。なお、前記ノイズ抽出用の閾値の設定方法は、特に制限されないが、例えば、予め準備した結晶のサンプルや画像サンプル等を用い、検出目標である蛋白質結晶の輝度変化情報と前記結晶以外の沈殿物や液滴等の輝度変化情報とを区別できる値に適宜設定する方法等があげられる。

したがって、二値化処理部 39 および細線化処理部 40 は、微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後細線化処理することにより複数の線から成る細線化画像を得る細線化画像生成部を構成する。そして細線化画像記憶部 41 は、細線化画像生成部で生成された細線化画像を記憶する。

ノイズ認識処理部 38 は、細線化画像記憶部 41 の細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出する。ノイズ除去処理部 37 は、微分画像記憶部 31 に記憶された微分画像から、ノイズ認識処理部 38 でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報を微分画像記憶部 31 の微分画像より除去する。

ここで、ノイズ認識処理部 38 がノイズとみなす線を検出するに際しては、後述するように複数のアルゴリズムを用いている。すなわち、線の長さおよび分岐数を求め、長さが所定値を超え且つ分岐数が少ない線をノイズとみなす第 1 のアルゴリズム、線の長さおよび直線性を認識し、長さが所定値を超え且つ直線性が高い線をノイズとみなす第 2 のアルゴ

リズム、さらには線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが所定値を超え且つ分散度合いが小さい線をノイズとみなす第3のアルゴリズムの3つを必要に応じて使い分け、または併用するようにしている。

- 5 なお、マスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ除去処理においては、上記例では微分画像記憶部31に記憶された微分画像を処理対象として実行する例を示しているが、二値化画像記憶部33に記憶された二値化画像を対象としてマスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ
- 10 除去処理を実行するように構成してもよい。

- 次に蛋白質結晶検出方法について説明する。まず、図6の処理部20が観察動作プログラム22bを実行することにより、観察動作が実行される。すなわち結晶化プレート6の各ウェル6aの液保持部6bに保持
- 15 された蛋白質溶液13の画像をカメラ7によって撮り込み（観察工程）、撮り込んだ画像を観察画像記憶部21bに記憶する（記憶工程）。これにより、観察画像記憶部21bには処理対象の観察画像が記憶される。

- ここで、観察対象の蛋白質溶液13の経時変化について、図9を参照して説明する。前述のように結晶化生成の開始に際しては、ウェル6a
- 20 の液保持部6bには、所定割合の結晶化溶液12が加えられた蛋白質溶液13の液滴が載置される（図3参照）。図9Aは、結晶化生成の初期における液保持部6bの断面の一例を示しており、この段階では蛋白質溶液13の液滴は液保持部6bのポケットをほぼ満たした状態にあり、液滴内部には未だ蛋白質結晶が見られない。

- 25 ここで結晶生育条件、すなわち結晶化溶液12の組成・濃度や保管温度が望ましい条件に適っている場合には、蛋白質溶液13内では時間の

経過とともに結晶化が進行する。図 9 B は、結晶化がある程度進行した状態における液保持部 6 b の断面の一例を示している。この状態では、蛋白質溶液 1 3 中の溶媒成分が徐々に蒸発することにより、液保持部 6 b のポケット内で液滴が縮小するにつれて液滴の輪郭が(矢印 B で示す)、
5 図 9 A の状態よりもポケット内部側に移動している。そして液滴の縮小によって露呈したポケット底面には、液滴内に含まれていた蛋白質が結晶化した蛋白質結晶 1 3 a が残留している。さらに液滴内部においても結晶化が進行し、蛋白質結晶 1 3 a が生成されている。

図 1 0 は、図 9 B に示す状態における観察画像の一例を示しており、
10 液保持部 6 b のポケット内で溶媒の蒸発がある程度進行し体積が縮小した状態の液滴を上方から撮り込んだ画像が含まれている。この観察画像中では、図 1 0 に示すように、低輝度の背景画像（密ハッチング部で示す）中に、液保持部 6 b の頂部を示す環状部分 A（疎ハッチング部で示す）が比較的高い輝度で現れている。

15 そしてこの環状部分 A の内側のポケット内には、蛋白質溶液 1 3 の液滴が輝度が部分によって異なる画像として現れている。ここで、環状部分 A の内側で液滴が存在しない部分は下方からの照明光（図 9 B 参照）が透過することによって高輝度部分となっており、蛋白質溶液 1 3 の液滴の輪郭 B はこの高輝度部分とのコントラストによって観察画像中で明
20 瞭に現れている。また環状部分 A の内周に沿って、部分的に線状の高輝度部分 C が現れている。

そして検出対象の蛋白質結晶 1 3 a は、環状部分 A の内側の領域に存在している。すなわち、蛋白質溶液 1 3 の液滴内部に存在する蛋白質結晶 1 3 a のうち、カメラ 7 による合焦レベル f（図 9 B 参照）の近傍に
25 存在する蛋白質結晶 1 3 a は、図 1 0 の観察画像中で合焦度が高く明瞭に現れ、合焦レベル f から外れた位置にある蛋白質結晶 1 3 a は合焦度

が低くぼやけた輪郭で現れる。またポケットの表面に残置された形で存在する液滴外の蛋白質結晶 1 3 a も同様に、合焦度が低くぼやけた輪郭で現れる。さらにこれ以外にも、観察画像中には結晶化に至らなかった沈殿物などの固形異物が存在する。

5

蛋白質結晶の検出において、観察画像中に現れるこれらの図形を目視観察によって正確に識別することは困難であり、検出対象の蛋白質結晶を高い信頼度で効率よく検出することができないため、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出方法では、図 6 のプログラム記憶部 2 2 に記憶され

10 た結晶検出プログラム 2 2 a を処理部 2 0 が実行することにより、観察画像に対して図 8 のフローに示す蛋白質結晶検出処理を行い、蛋白質結晶の識別を自動的に行わせるようにしている。

図 8 における蛋白質結晶検出処理は、まず、観察画像に対して微分処理を行う (S T 1)。すなわち、予め観察画像記憶部 2 1 b に記憶された

15 蛋白質溶液の観察画像を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する (微分処理工程)。これにより、図 1 1 に示すように、図 1 0 の観察画像中に現れている蛋白質結晶 1 3 a の外形を示す形状線や、液滴の輪郭 B、環状部分 A の内周の高輝度部分 C など、輝度変化が大きい部分が高輝度で現れる。なお、微分

20 画像は本来各画素が輝度変化値に応じた明るさで現れる多値画像であるが、図 1 1 では図示の便宜のため白黒 2 値画像で表している。

次いで、この微分画像に対して、マスク処理を行う (S T 2)。ここでは、蛋白質溶液 1 3 を保持している結晶化プレート 6 の液保持部 6 b に由来する輝度変化情報を微分画像から除去する (容器ノイズ除去工程)。

25 容器ノイズ除去は、結晶化プレート 6 の液保持部 6 b の形状として予め教示されているマスク情報に基づいて、蛋白質溶液 1 3 が保持されてい

る可能性のない所定領域の輝度変化情報を除去することにより行われる。

ここでは、図 1 1 に示す微分画像中の輝度変化情報のうち、蛋白質溶液 1 3 が保持されている範囲以外に存在する輝度変化が大きい部分、すなわち図 1 0 に示す環状部分 A の内周部を含んでこれらよりも外側の領域に現れる輝度変化が大きい部分をノイズとして除去する。これにより、
5 図 1 2 に示すように、蛋白質結晶が存在する可能性がある領域のみを含んだ微分画像（マスク処理）が得られる。

このようにしてマスク処理が行われた微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理し、さらに細線化処理を行う（S T 3）。図 1 3 は、この細
10 線化処理によって得られた細線化画像を示しており、微分画像中の高輝度部分、すなわちタンパク質結晶 1 3 a の形状線や液滴の輪郭などは、いずれも幅が 1 画素の線に置き換えられている。そしてこのようにして作成された細線化画像に基づいて、ノイズ抽出を行う。すなわち、細線化画像に含まれるノイズを認識する（S T 4）。

15 ここで、ノイズ認識方法の例を図 1 6 ～ 1 8 を参照して説明する。図 1 6 ～ 1 8 に示す例はいずれも、上述の輪郭 B に該当する線など、ある程度の連続した長さを有ししかも蛋白質結晶の特徴的形状に合致しないものをノイズとみなして検出するものである。ここでは、細線化画像中の複数の線をまとまりごとにラベリングし、個々のラベルのうち、線の
20 長さが所定値を超えるラベルについて以下に説明するアルゴリズムでノイズに該当するか否かを認識するようにしている。この場合、細線化処理された画像を対象としてラベリングを行っていることから、ラベル面積そのものが各ラベルにおける線の長さを示している。

図 1 6 A および 1 6 B は、このノイズ認識の第 1 のアルゴリズムを示
25 している。まず、線の長さが所定値を超えるラベルについて、ラベルを構成する線が分岐する分岐点を求め、求められた分岐点の数に基づいて

ノイズであるか否かを判定する。例えば図 1 6 A に示すラベル L 1 の例では、線 n の長さは所定値以上であるものの、分岐点 P が多いことからノイズとはみなされない。

これに対し図 1 6 B に示すラベル L 2 の例では、線 n の長さは所定値
5 以上であり、しかも分岐点 P が 1 つしかなく、「分岐数が少ない」と判断する判定値を超えていないことからノイズとみなされる。すなわち第 1 のアルゴリズムの例では、ノイズ認識工程において、線の長さおよび分岐数を求め、長さが所定値を超え且つ分岐数が少ない線をノイズとみなすようにしている。なお、分岐点の数に基づいてノイズであるか否かを
10 判断する別の方法として、線の長さを分岐数で割った値が所定の長さを超えていなければ分岐数が少ない線と判断するようにしてもよい。

図 1 7 は、第 2 のアルゴリズムを示している。ここでは、線の長さが所定値を超えるラベルについて、ラベルを構成する線の直線性を判定することによってノイズであるか否かを判定する。例えば図 1 7 に示すラ
15 ベル L 3 において、ラベルを構成する線 n の探索を行い、探索起点 P S から探索を開始した線 n が、探索終点 P E において予め規定された探索許容幅 V の範囲内に収まっている場合に直線性が高いと判断し、この線 n をノイズと判定する。すなわち第 2 のアルゴリズムの例では、ノイズ認識工程において、線の長さおよび直線性を認識し、長さが所定値を超
20 え且つ直線性が高い線をノイズとみなすようにしている。

さらに図 1 8 は第 3 のアルゴリズムを示している。ここでは、ラベルを構成する複数の線の近似直線に対する分散度合いを求めることによってノイズであるか否かを判定する。例えば図 1 8 A に示すラベル L 4 において、ラベルを構成する複数の線 n 全体を近似する近似直線 A N を求
25 める。そしてこの近所直線 A N を挟む所定枠 M 内において、線 n の近似直線 A N に対する分散度合いを求める。この場合には、複数の線 n が錯

綜して状態にあることから分散度合いは大きく、ノイズとはみなされない。

これに対し、図 1 8 B に示すラベル L 5 の例では、線 n は近似直線 A N にほぼ沿っており近似直線 A N に対する分散度合いが小さいことから
5 ノイズとみなされる。すなわち第 3 のアルゴリズムの例では、ノイズ認識工程において、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが所定値を超え且つ分散度合いが小さい線をノイズとみなすようにしている。なお、このようなノイズの認識方法における各パラメータの設定方法は、特に制限されないが、例えば、予め準備したノイズ
10 および結晶の画像サンプル等を用い、除去したいノイズを検出する値に適宜設定する方法等があげられる。

そしてこのようにしてノイズが認識されたならば、ノイズとみなされて検出された線を二値化処理された微分画像から除去するノイズ除去処理を行う (S T 5)。すなわち、(S T 3)、(S T 4)、(S T 5) において
15 ては、微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後細線化処理することにより、複数の線からなる細線化画像を得る (細線化画像生成工程)。

そして生成された細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出し (ノイズ認識工程)、ノイズ認識工程でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報を
20 微分画像より除去する (ノイズ除去工程)。図 1 4 は、このようにしてノイズが除去された微分画像 (ノイズ除去) を示している。

この後、蛋白質結晶に該当する可能性が高い特徴部分の抽出を行う。まず、微分画像 (ノイズ除去) を特徴部抽出用の閾値で二値化処理する (S T 6)。すなわち、微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化すること
25 により、大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る (二値化処理工程)。ここで用いられる閾値は、前述のノ

イズ抽出用の閾値よりも高い値に設定される。

また、二値化処理工程においては、特徴部分についてラベリングを行い、面積が所定値よりも大きいラベルのみを残してその他を消去する処理を行う。これにより、蛋白質結晶である可能性が少ない小さな特徴部分
5 分がノイズとみなされて除去される。図 15 は、このようにして得られた二値化画像を示しており、この画像中には、蛋白質結晶である可能性が高い特徴部分のみが現れている。そして得られた二値化画像記憶部 33 に記憶される。

なお、前述の容器ノイズ除去工程、ノイズ除去工程を、二値化画像記憶部 33 に記憶された二値化画像を対象として行うようにしてもよい。
10 この場合には、二値化画像中に残された特徴部分のうち、ノイズとみなされて検出された線に該当するものを二値化画像から除去する。

この後、得られた二値化画像を対象として結晶化判定を行う（S T 7）。例えば、二値化画像中の特徴部分が少ない場合には、結晶化や結晶化の
15 進行の可能性無しと判断し、特徴部分が多い場合には、結晶化や結晶化の進行の可能性ありと判断する。特徴部分の多い少ないは、特徴部分に相当する面積の合計を所定値と比較することによって決定される。前記所定値は、特に制限されないが、例えば、予め準備した結晶サンプルや画像サンプル等を用いて算出された特徴部分に相当する面積を用いて適
20 宜設定することができる。すなわちここでは、二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および蛋白質結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する（結晶化判定工程）。

そしてここで結晶化の可能性がなしと判定されたならば、処理を終了する。また（S T 8）にて結晶化の可能性ありと判定されたならば、当
25 該処理において対象とした観察画像が得られた結晶化プレート 6 を示す結晶化プレート情報、ウェル情報、観察画像、観察時刻などの結晶化情

報を結晶化情報記憶部 21c に記憶し (ST9)、当該観察画像を対象とした蛋白質検出処理を終了する。

上記説明したように、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出においては、
5 蛋白質溶液の画像を微分処理することにより、検出対象の蛋白質結晶の輪郭に相当する部分を輝度変化が大きい部分としてとしてまず抽出する。そしてこの輝度変化が大きい部分を特徴部抽出用の閾値で切り分けることにより、大きな輝度変化を示す部分を特徴部分として残した二値化画像を求める。そして蛋白質結晶の有無の判断を、この二値化画像の特徴
10 部分より行うようにしている。これにより、個人的な熟練度の相違による結晶検出作業の効率や検出結果の信頼性のばらつきを排除することができ、蛋白質結晶の検出を効率よく高い信頼性で行うことができる。

なお、本実施の形態では、二値化画像の特徴部分にノイズを含まないようにマスク処理部 35 やノイズ除去処理部 37 で処理を行っているが、
15 容器の形状や照明の条件等によりノイズを殆ど含まない観察画像が得られる場合には、マスク処理部 35 やノイズ除去処理部 37 での処理を省略することができる。

産業上の利用の可能性

20 従来は、蛋白質結晶の検出は、専ら観察担当者の目視観察に依存していたが、本発明によれば、蛋白質結晶の検出を自動化でき、かつ、効率よく高い信頼性で行うことができる。また、本発明の蛋白質結晶検出方法は、例えば、蒸気拡散法等の蛋白質結晶化条件のスクリーニング方法に使用でき、本発明の蛋白質結晶検出装置は、例えば、蒸気拡散法等の
25 蛋白質結晶化条件のスクリーニング装置や蛋白質結晶の製造装置に使用できる。

請 求 の 範 囲

1. 蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法であって、
蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を微分処理することにより輝度
5 変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理
工程と、
前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変
化情報のうち大きな輝度変化を示す部分を特徴部分として残した二値化
画像を得る二値化処理工程と、
- 10 前記二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の
有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定工程とを含むことを特徴と
する蛋白質結晶検出方法。
2. さらに、結晶化対象の蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由
15 来する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像お
よび前記二値化画像の少なくとも一方から除去する容器ノイズ除去工程
を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の蛋白質結晶検出方法。
3. 前記容器ノイズ除去工程は、予め教示されている情報に基づいて
20 所定領域の輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去するこ
とを特徴とする請求の範囲第2項に記載の蛋白質結晶検出方法。
4. さらに、前記微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後に細
線化処理することにより、複数の線からなる細線化画像を得る細線化画
25 像生成工程と、前記細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識
することにより、ノイズとみなす線を検出するノイズ認識工程と、前記

ノイズ認識工程でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方から除去するノイズ除去工程を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の蛋白質結晶検出方法。

5

5. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第4項に記載の蛋白質結晶検出方法。

10

6. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線性が予め決定した値より高い線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第4項に記載の蛋白質結晶検出方法。

15

7. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第4項に記載の蛋白質結晶検出方法。

20

8. さらに、結晶化容器に保持された蛋白質溶液の画像をカメラで撮り込む観察工程と、前記カメラで撮り込んだ観察画像を観察画像記憶部に記憶する記憶工程とを含み、前記微分処理工程は、前記観察画像記憶部に記憶した画像に対して行うことを特徴とする請求の範囲第1項に記

25

載の蛋白質結晶検出方法。

9. 蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置であって、
蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を記憶する観察画像記憶部と、
前記観察画像記憶部の観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理部と、
- 5 前記微分処理部で生成された前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る二値化処理部と、
前記二値化処理部で得られた二値化画像を記憶する二値化画像記憶部と、
前記二値化画像記憶部の二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定部とを
- 10 備えたことを特徴とする蛋白質結晶検出装置。
10. さらに、蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由来する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を、前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方から
- 15 除去する容器ノイズ除去部を備えたことを特徴とする請求の範囲第9項に記載の蛋白質結晶検出装置。
11. さらに、マスク情報を記憶するマスク情報記憶部を備え、前記
- 20 容器ノイズ除去部は、前記マスク情報に基づいて前記輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方から除去することを特徴とする請求の範囲第10項に記載の蛋白質結晶検出装置。
- 25 12. さらに、前記微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化した後に細線化処理することにより複数の線からなる細線化画像を得る細線化画

- 像生成部と、前記細線化画像生成部で生成された細線化画像を記憶する細線化画像記憶部と、前記細線化画像記憶部の細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することによりノイズとみなす線を検出するノイズ認識処理部と、前記微分画像記憶部の微分画像および前記二値化
- 5 画像記憶部の二値化画像の少なくとも一方から前記ノイズ検出処理部によってノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去するノイズ除去処理部を備えたことを特徴とする請求の範囲第9項に記載の蛋白質結晶検出装置。
- 10 13. 前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第12項に記載の蛋白質結晶検出装置。
- 15 14. 前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線性が予め決定した値より高い線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第12項に記載の蛋白質結晶検出装置。
- 20 15. 前記ノイズ認識処理部が、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第12項に記載の蛋白質結晶検出装置。
- 25 16. さらに、結晶化対象の蛋白質溶液を保持する結晶化容器がセットされる観察ステージと、前記観察ステージにセットされた結晶化容器

の蛋白質溶液を撮像して画像を撮り込むカメラとを備え、前記カメラで撮り込んだ蛋白質溶液の画像を前記観察画像記憶部に記憶することを特徴とする請求の範囲第 9 項に記載の蛋白質結晶検出装置。

- 5 17. 蛋白質溶液内で生成した蛋白質結晶を検出する処理をコンピュータに実行させる蛋白質結晶検出プログラムであって、前記タンパク質結晶の検出処理が、蛋白質溶液を観察して得られた観察画像を微分処理することにより輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなる微分画像を生成する微分処理工程と、前記微分画像を特徴部抽出用の閾値で二値化することにより前記輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残した二値化画像を得る二値化処理工程と、前記二値化画像の特徴部分より蛋白質結晶の有無および結晶化の進行の有無の少なくとも一方を判断する結晶化判定工程とを含むことを特徴とする蛋白質結晶検出プログラム。
- 10

15

18. さらに、前記タンパク質結晶の検出処理が、結晶化対象の蛋白質溶液を保持している結晶化容器に由来する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方から除去する容器ノイズ除去工程を含むことを特徴とする請求の範囲第 17 項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。
- 20

19. 前記ノイズ除去工程は、予め教示されている情報に基づいて所定領域の輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を除去することを特徴とする請求の範囲第 18 項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。

25

20. さらに、前記タンパク質結晶の検出処理が、前記微分画像をノ

- イズ抽出用の閾値で二値化した後に細線化処理することにより複数の線からなる細線化画像を得る細線化画像生成工程と、前記細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出するノイズ認識工程と、前記ノイズ検出工程でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報および特徴部分の少なくとも一方を前記微分画像および前記二値化画像の少なくとも一方より除去するノイズ除去工程を含むことを特徴とする請求の範囲第17項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。
- 5
- 10 21. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび分岐数を求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分岐数が予め決定した値より少ない線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。
- 15 22. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび直線性を認識し、長さが予め決定した所定値を超え且つ直線性が予め決定した値より高い線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。
- 20 23. 前記ノイズ認識工程において、線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが予め決定した所定値を超え且つ分散度合いが予め決定した値より小さい線をノイズとみなすことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。
- 25 24. さらに、前記タンパク質結晶の検出処理が、結晶化容器に保持された蛋白質溶液を観察してカメラにより観察画像を撮り込む観察工程

と、前記カメラで撮り込んだ観察画像を観察画像記憶部に記憶する記憶工程とを含み、前記微分処理工程は、前記観察画像記憶部に記憶した画像に対して行うことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の蛋白質結晶検出プログラム。

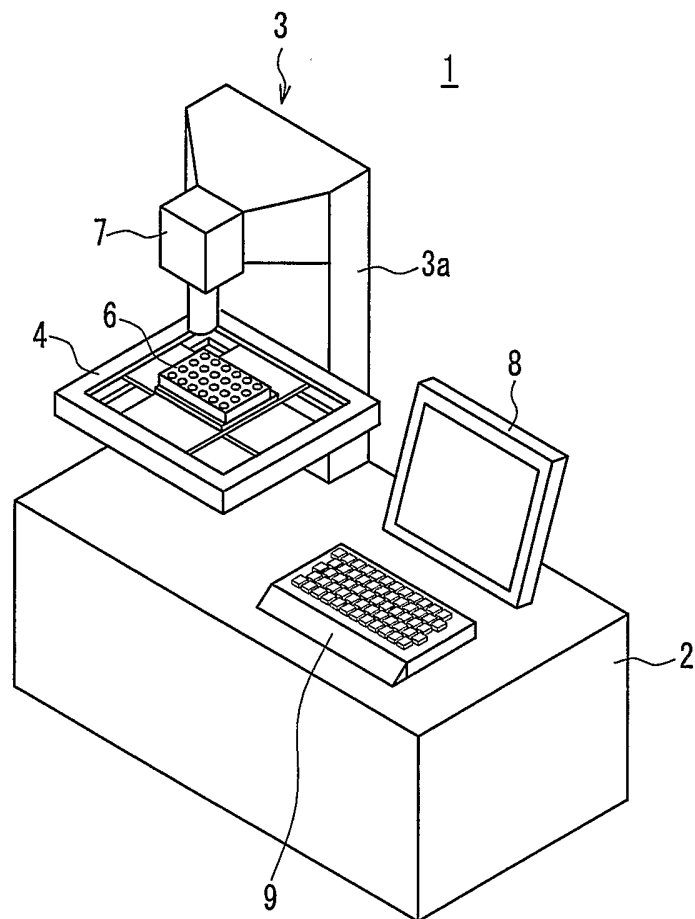


FIG. 1

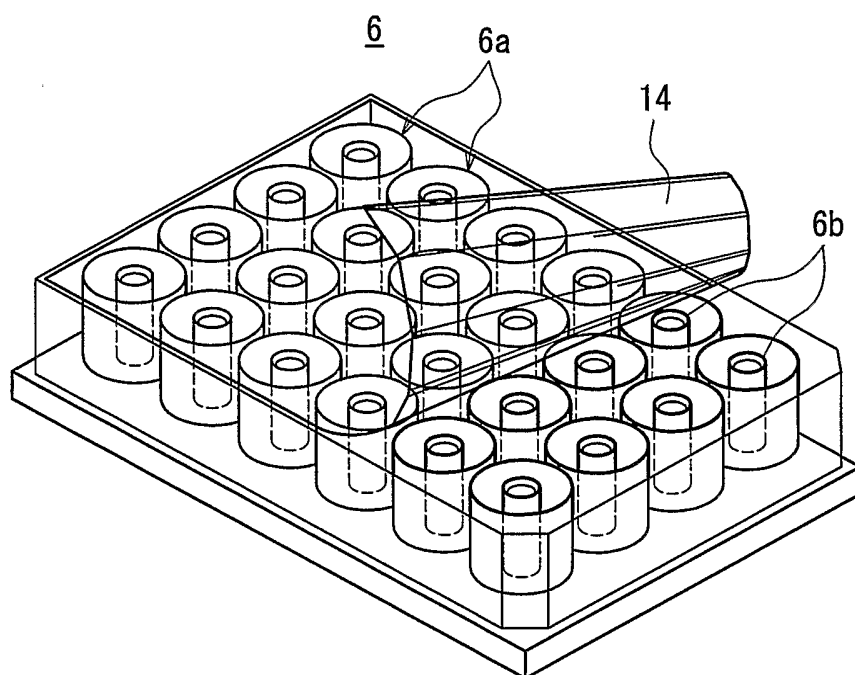


FIG. 2

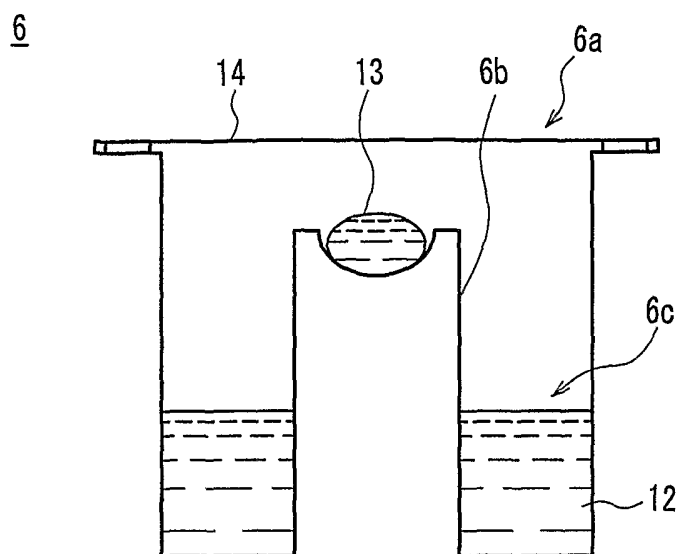


FIG. 3

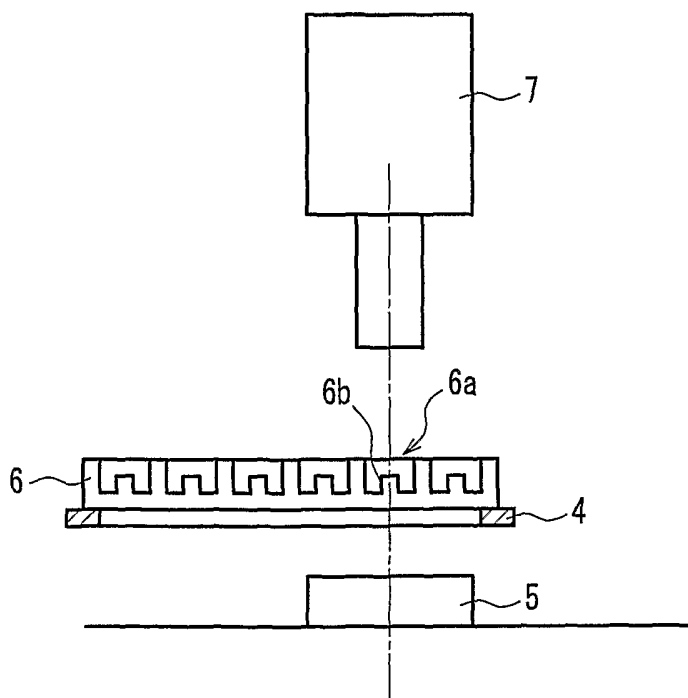


FIG. 4

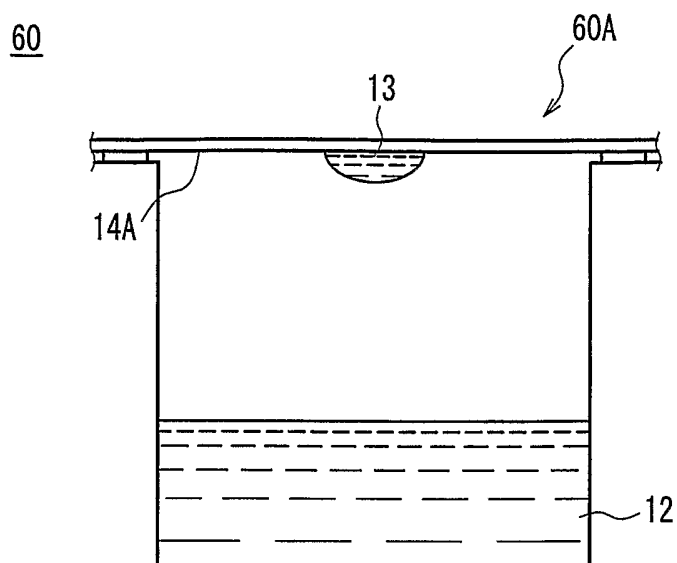


FIG. 5

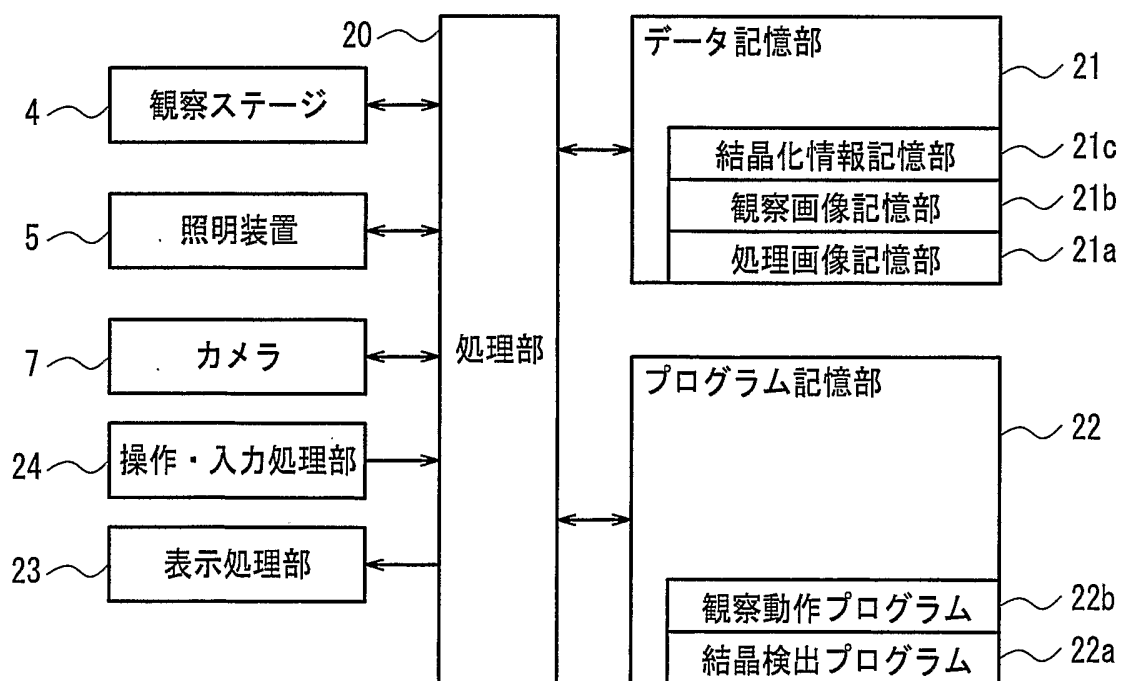


FIG. 6

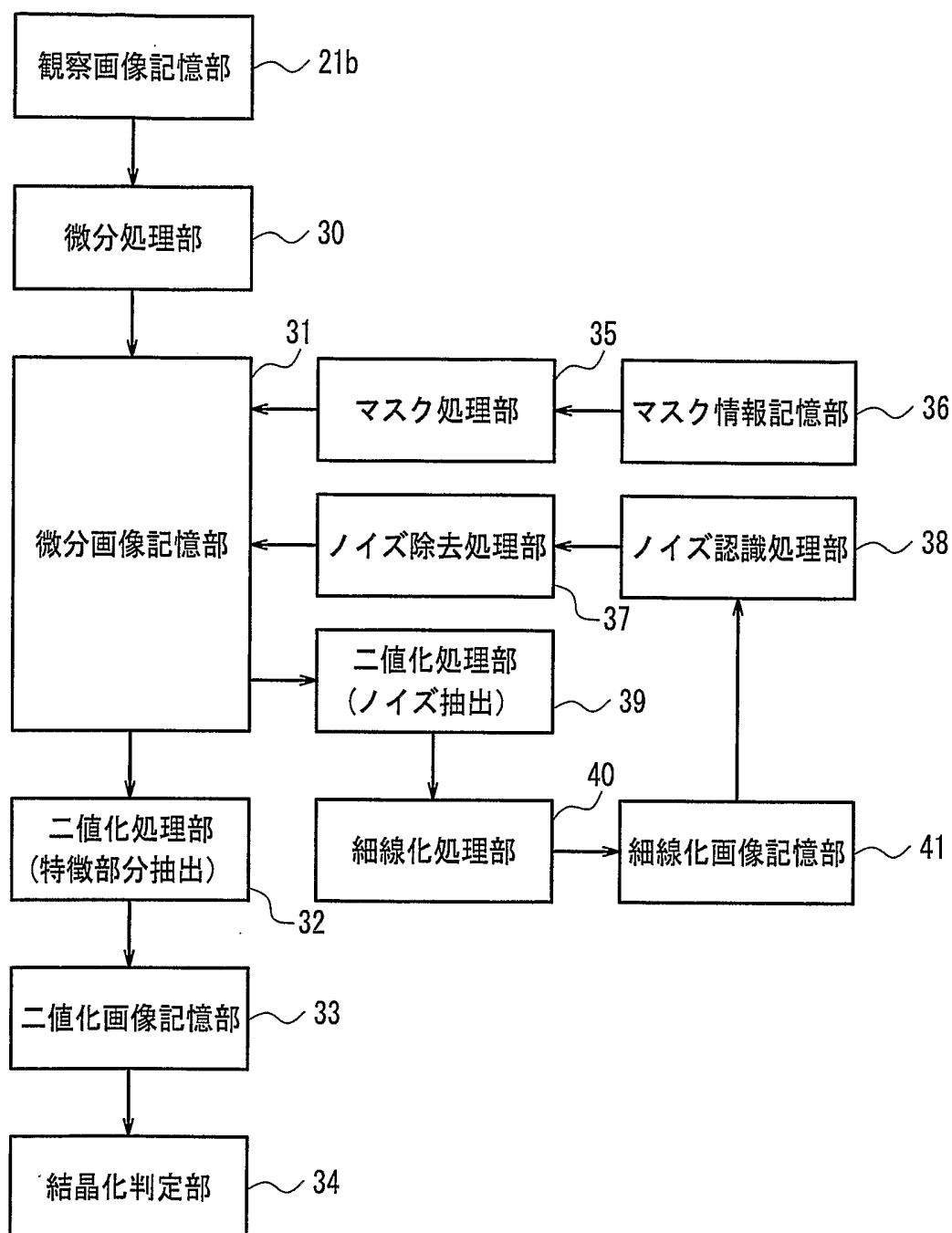


FIG. 7

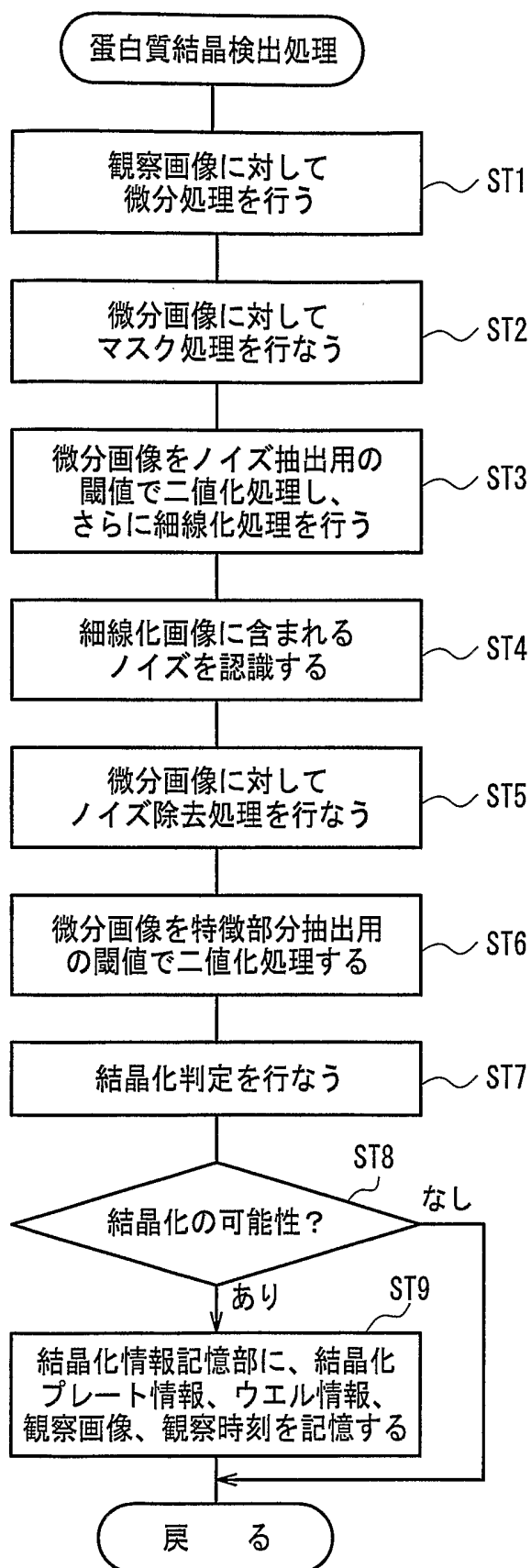


FIG. 8

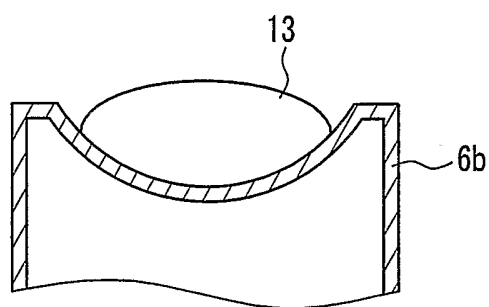


FIG. 9A

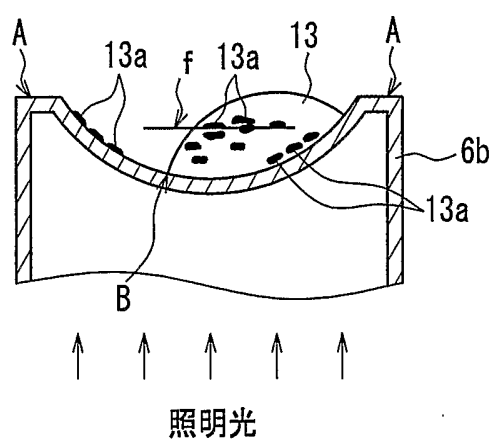


FIG. 9B

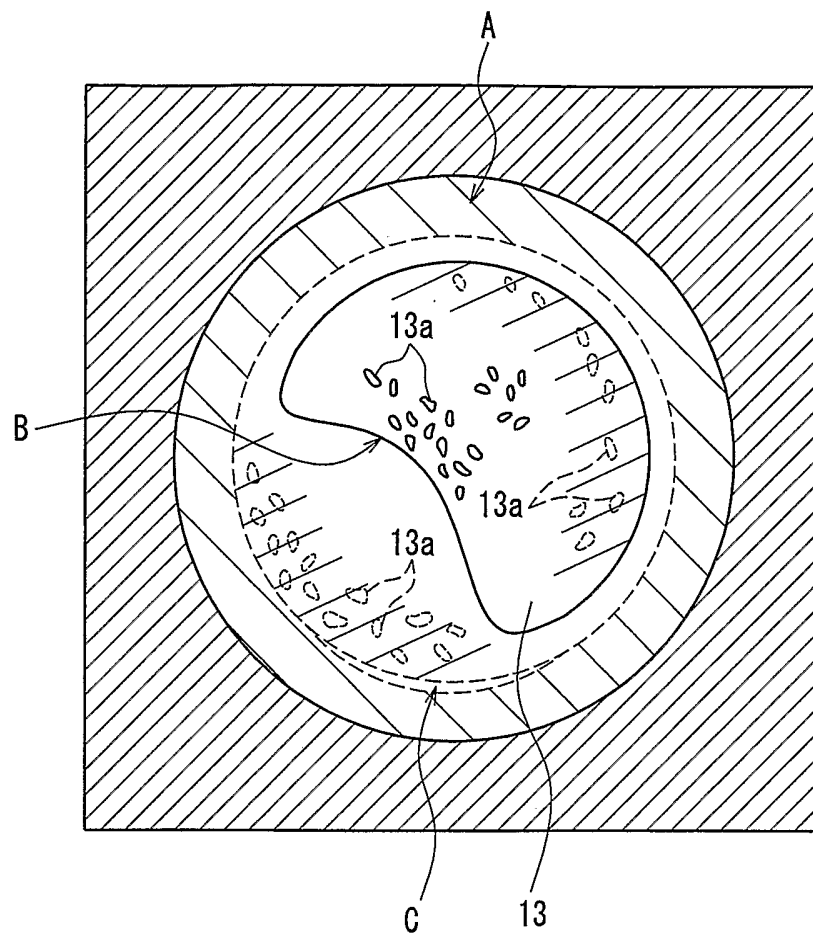


FIG. 10

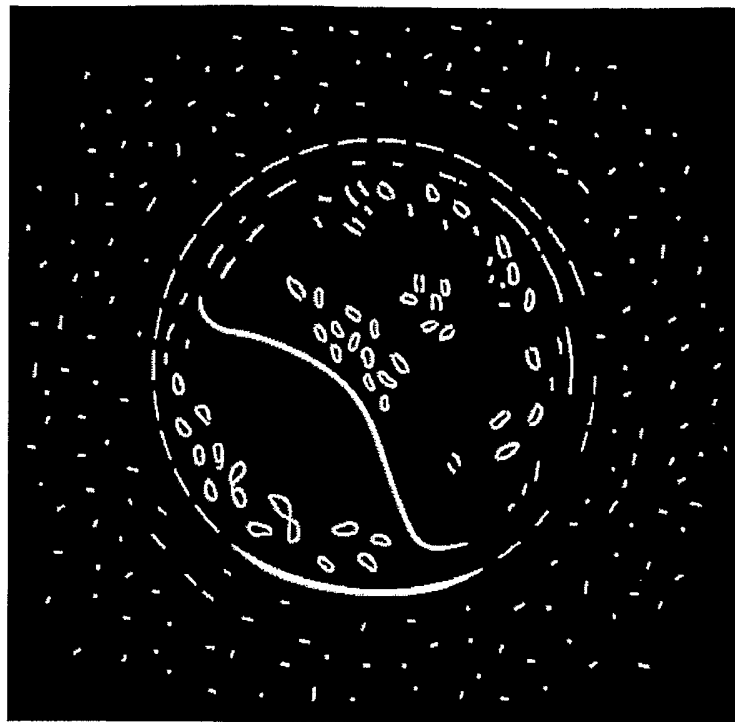


FIG. 11

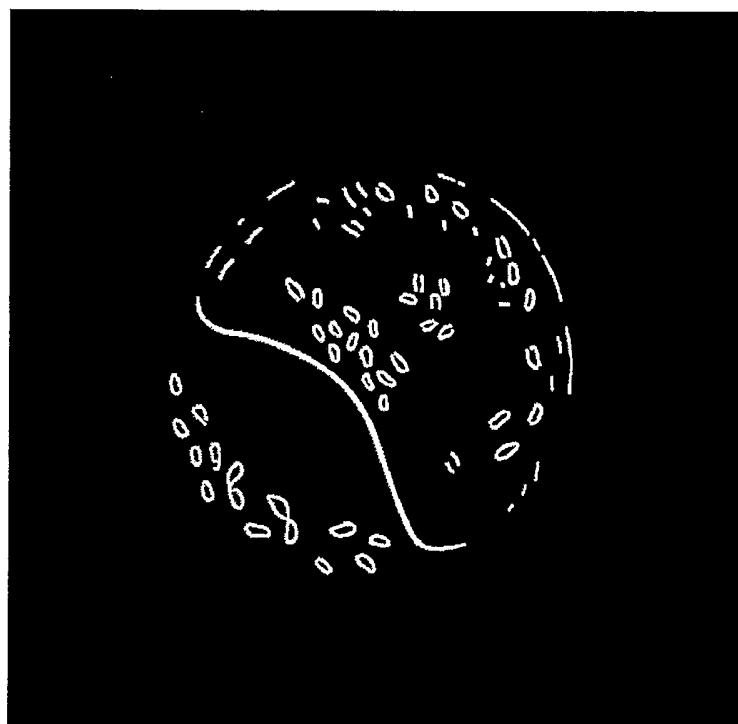


FIG. 12

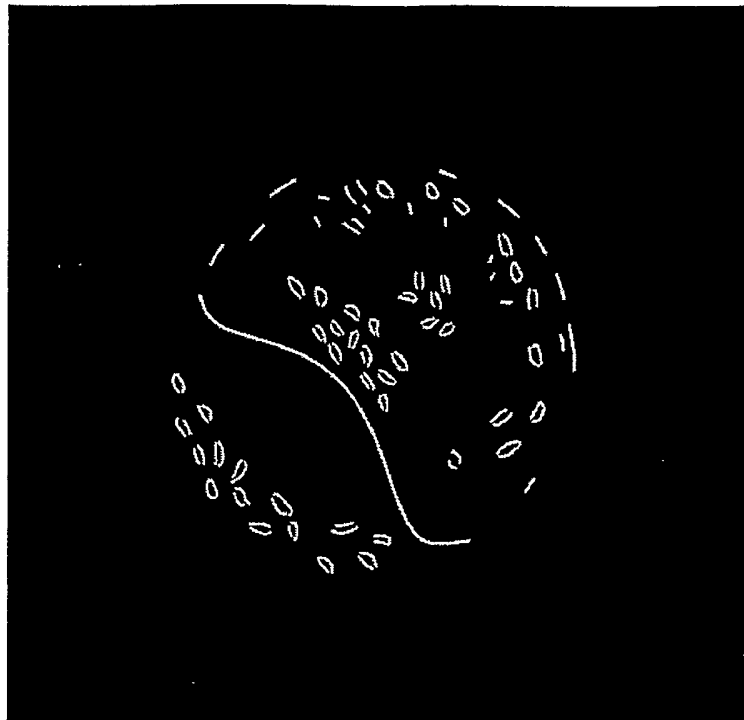


FIG. 13

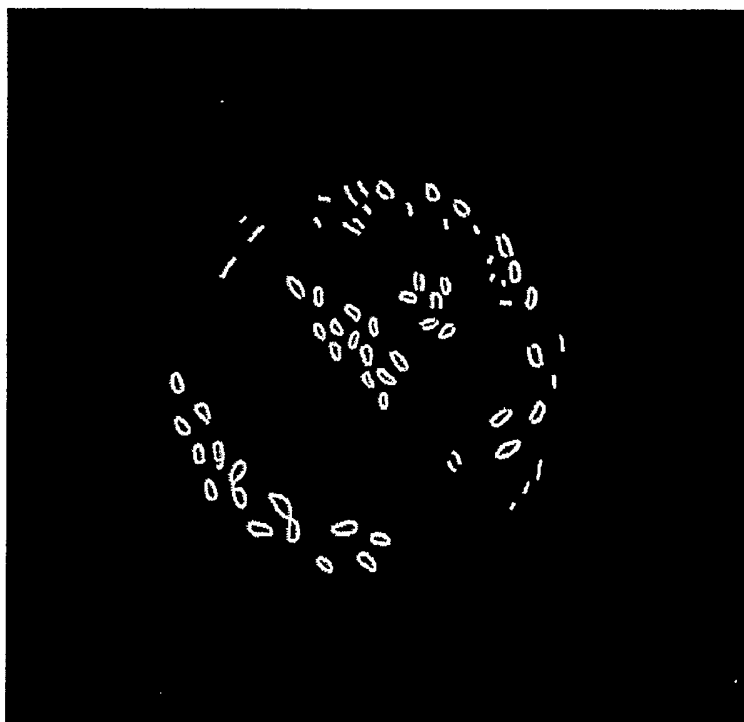


FIG. 14

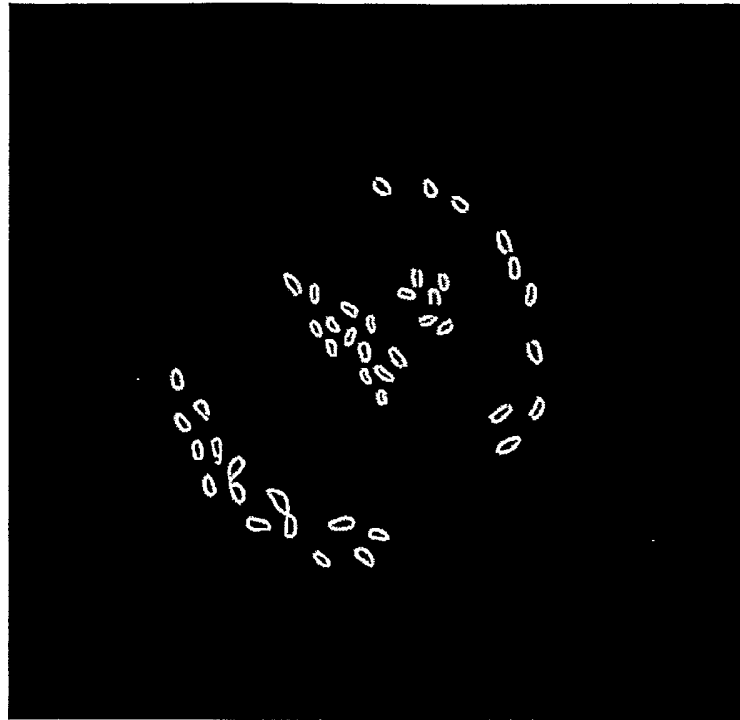


FIG. 15

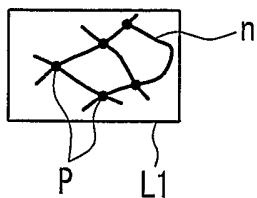


FIG. 16A

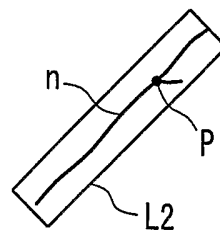


FIG. 16B

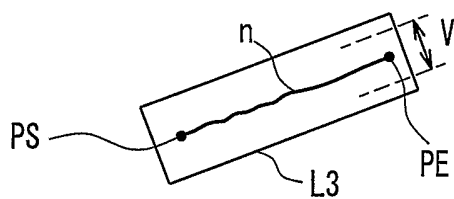


FIG. 17

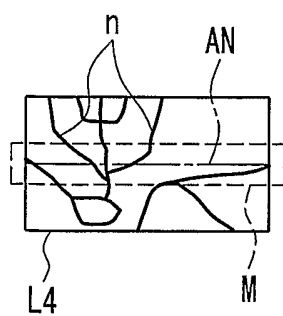


FIG. 18A

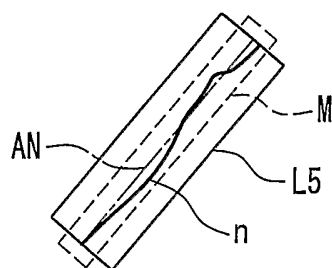


FIG. 18B