

内 Tokyo (JP). 田中 修平 (TANAKA Shuhei);
〒1086290 東京都港区港南二丁目 1 5 番 3
号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外 (NISHIZAWA Kazuyoshi
et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一
丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

規則4. 17に規定する申立て:

- 一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関
する申立て (規則4. 17(v))

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

解析システム、観察容器、解析方法およびプログラム

技術分野

[0001] 本発明の実施形態は、解析システム、観察容器、解析方法およびプログラムに関する。

本願は、2021年8月16日に、日本に出願された特願2021-132304号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 従来、透明媒質中の回転楕円体透明粒子の特性を決定し、それを計数する方法が知られている（例えば、特許文献1参照）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第6039570号公報

発明の概要

[0004] 本発明の一態様は、培地で培養された複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得する取得部と、前記細胞画像に含まれるそれぞれの前記培養細胞の輝度値と細胞径とに基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の前記培養細胞について生存状態を解析する画像解析部とを備える、解析システムである。

本発明の一態様は、培地と複数の細胞を収容する収容部を有し、前記複数の細胞の定量位相画像を取得して観察するための観察容器であって、前記収容部は、前記培地で浮遊する前記細胞を所定観察時間の間、前記観察光学系の合焦範囲に滞在させる条件を満たすように形成される、観察容器である。

[0005] 本発明の一態様は、コンピュータが実行する解析方法であって、複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、導出する前記ステップで導出した屈折率差

を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞について、培養細胞の生存率と生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出するステップとを有する、解析方法である。

本発明の一態様は、コンピュータが実行する解析方法であって、複数もしくは単数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞について、高い屈折率差を有する集団が培養細胞の中で抗体生産能力の優れた細胞であると判断するステップとを有する、解析方法である。

[0006] 本発明の一態様は、コンピュータに、複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞について、培養細胞の生存率と生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出するステップとを実行させるプログラムである。

本発明の一態様は、コンピュータに、複数もしくは単数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、取得する前記ステップで取得した前期細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する情報に基づいて、前期細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞について、高い屈折率差を有する集団が培養細胞の中で抗体生産能力の優れた細胞であると判断するステップとを実行させるプログラムである。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]本実施形態の解析システムの構成を示す概念図である。

[図2]本実施形態に係る解析システムに含まれる解析装置の構成を示した図で

ある。

[図3]位相物体を透過した光の強度分布が変化する点を説明するための概念図である。

[図4]位相分布 ϕ の算出のために行う対象物Sからの光の検出方法を説明するための図である。

[図5]対象物Sを撮像する際の対物レンズ21aの焦点と計測面 $i_1 \sim i_3$ の配置例を示す。

[図6]サンプリング間隔を説明するための図である。

[図7]サンプリング間隔 Δx の設定方法を示す概念図である。

[図8A]容器の例1を示す図である。

[図8B]容器の例2を示す図である。

[図9]明視野画像の一例を示す図である。

[図10]定量位相画像の一例を示す図である。

[図11]本実施形態に係る解析システムの定量位相解析結果の一例を示す図である。

[図12]培地と細胞内との屈折率差を説明するための図である。

[図13]2値化閾値の決定方法を説明するための図である。

[図14]本実施形態に係る解析システムの動作の例1を示すフローチャートである。

[図15]本実施形態に係る解析システムの動作の例2を示すフローチャートである。

[図16]本実施形態に係る解析システムの動作の例3を示すフローチャートである。

[図17]本実施形態の解析システムに含まれる解析装置が表示する解析結果の一例を示す概念図である。

[図18]実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置の構成を示した図である。

[図19]培養装置の一例を示す図である。

[図20]比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) の平均値との関係の一例を示す図である。

[図21]実施形態の変形例に係る解析システムの動作の一例を示すフローチャートである。

[図22]実施形態の変形例に係る解析システムの動作の一例を示すフローチャートである。

[図23]実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置が表示する表示画面の例 1 を示す概念図である。

[図24]実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置が表示する表示画面の例 2 を示す概念図である。

[図25]明視野画像の一例を示す図である。

[図26]対物レンズ NA と焦点深度との関係の一例を示す図である。

[図27]観察容器の一例を示す図である。

[図28]観察容器の一例を示す図である。

[図29A]観察容器の他の例 1 を示す図である。

[図29B]観察容器の他の例 2 を示す図である。

[図29C]観察容器の他の例 3 を示す図である。

[図30A]観察容器の他の例 4 を示す図である。

[図30B]観察容器の他の例 5 を示す図である。

[図30C]観察容器の他の例 6 を示す図である。

[図30D]観察容器の他の例 7 を示す図である。

[図31]観察容器の他の例 8 を示す図である。

[図32]観察容器の他の例 9 を示す図である。

発明を実施するための形態

[0008] (実施形態)

以下、図面を参照して、本実施形態に係る解析システム、解析方法およびプログラムについて説明する。

本実施形態の解析システム 1 は、対象物における間隔 Δz 離れた複数の位

置のそれぞれに、対物レンズの焦点（つまり、合焦面）を配置しつつ照明光を照射し、焦点が配置されたそれぞれの領域（つまり、それぞれの合焦面）からの光を検出し、当該検出により取得したデータに基づいて定量位相画像を作成するものである。当該間隔 Δz は、対物レンズの開口数、照明光の波長および対物レンズと対象物の間の屈折率などに基づいて設定する。

[0009] ここで、定量位相画像とは、対象物における厚さの変化と屈折率の変化を積とする位相を表す（画像化した）画像である。既存の位相差画像や微分干渉画像は、位相に振幅が混ざる干渉画像であるため、対象物の位相を完全に定量化することはできないが（振幅が無視でき、かつ位相が小さい条件のみ定量化できるが）、定量位相画像は、対象物の位相が2倍、3倍、4倍等の様々な値に変化しても、定量的な位相を表すことができるため、対象物の位相を定量化した画像と称することもできる。

[0010] 図1は、本実施形態の解析システムの構成を示す概念図である。解析システム1は、顕微鏡本体部100と、解析装置40とを備える。顕微鏡本体部100は、顕微鏡、すなわち定量位相顕微鏡であり、対象物Sに照明光を照射する透過照明光学系10と、ステージ8と、結像光学系7と、落射照明光学系110と、検出部9とを備える。結像光学系7は、対物光学系20と、フィルターキューブ120と、リレー光学系30とを備える。

なお、解析装置40の機能は顕微鏡本体部100から物理的に離れた電子計算機等に配置してもよい。

[0011] 透過照明光学系10は、光源11と、レンズ12と、バンドパスフィルター13と、視野絞り14と、レンズ15と、開口絞り16と、集光レンズ17とを備える。対物光学系20は、対物レンズ21を備える。対物レンズ21としては、対物レンズ21a、対物レンズ21b、および対物レンズ21cの複数の対物レンズを選択して使用できる。リレー光学系30は、結像レンズ31と、ビームスプリッター32と、ミラー33a、ミラー33b、およびミラー33cと、レンズ34a、レンズ34b、レンズ34cと、接眼レンズ35とを備える。接眼レンズ35は眼Eを近づけて覗き込むことがで

きるように構成されている。

なお、交換可能な対物レンズ 21 の数は特に限定されない。また、顕微鏡本体部 100 に含まれる光学系の態様は、対象物 S の所望の面の画像を撮像により取得することができれば特に限定されない。

[0012] 図 1 において、顕微鏡本体部 100 の光学系の光軸を一点鎖線 L1 で示し、光源 11 からの照明光（光束）を二点鎖線 L2 で模式的に示した。対物レンズ 21 のうち、対象物 S に焦点を配置しているレンズを対物レンズ 21a とすると、後に詳述する対物レンズ 21a の光軸 L_o は、顕微鏡本体部 100 の光軸 L1 と一致しているため、これを図 1 において L1（L_o）と示した。検出部 9 で検出された光の検出信号の流れを実線矢印 A1 で示し、解析装置 40 による顕微鏡本体部 100 の制御を実線矢印 A2 で模式的に示した。一点鎖線 L1、一点鎖線 L2、実線矢印 A1、実線矢印 A2 は以下の実施形態でも同様のものを示す。

[0013] 光源 11 は、ハロゲンランプ等の非コヒーレント光源装置を含み、対象物 S に照射する照明光 L2 を出射する。本実施形態では、光源 11 は非コヒーレント光を出射し、出射された非コヒーレント光が、後述する開口絞り 16 を含む透過照明光学系 10 の各部により、位相復元が可能な光軸に略垂直な波面を有する光とされて対象物 S に照射される構成となっている。

「位相復元」とは、後に詳述するが、計測した対象物 S からの光の強度から、強度輸送方程式を用いて対象物 S の位相値を算出することである。照明光 L2 は、対象物 S の位相計測が可能であればどのような波長の光でも構わないが、可視光で見えづらい対象物を位相計測により可視化できる観点では、そのまま可視光を使用することが簡素で好ましい。

なお、対象物 S に照射する照明光 L2 は、可視光でなくてもよく、紫外光や赤外光であってもよい。さらに、照明光 L2 の波面は光軸に略垂直でなくとも、波面の形状が既知であればよく、例えば、照明光 L2 の波面は略球面であってもよい。また、光源 11 は、パルスレーザや連続発振（CW）レーザなどのコヒーレント光源を含み、照明光 L2 としてコヒーレント光を出射

してもよい。

[0014] 光源 1 1 から出射した照明光 L 2 は、レンズ 1 2 に入射する。レンズ 1 2 に入射した照明光 L 2 は、レンズ 1 2 により屈折され略平行な光となってレンズ 1 2 を出射し、バンドパスフィルター 1 3 に入射する。バンドパスフィルター 1 3 に入射した照明光 L 2 は、所望の波長範囲の波長成分の光のみがバンドパスフィルター 1 3 により透過されて、視野絞り 1 4 に入射する。

ここで、バンドパスフィルター 1 3 により透過される光の波長範囲は、軸上色収差によって発生する、位相を復元する際の、位相の実測値と実際の位相との誤差（後述の位相復元誤差）が大きくなり過ぎないように適宜設定される。バンドパスフィルター 1 3 は適宜光路外の位置 P 1 に退避可能に構成される。

なお、光源 1 1 としてレーザ光等の波長範囲が狭い光源を用いる際は、バンドパスフィルター 1 3 を光路に配置する必要は無い。また、バンドパスフィルター 1 3 は用いずに、対象物 S に対して結像側に配置されたフィルターキューブ 1 2 0 のフィルターにより検出する波長範囲を制限してもよい。

[0015] 視野絞り 1 4 に入射した照明光 L 2 は、その光束径が調節されて視野絞り 1 4 を出射し、レンズ 1 5 に入射する。レンズ 1 5 に入射した照明光 L 2 は、レンズ 1 5 により収束されてレンズ 1 5 を出射し、開口絞り 1 6 に入射する。開口絞り 1 6 に入射した照明光 L 2 は、その波面が球面状になるように変換され、開口絞り 1 6 を出射し、集光レンズ 1 7 に入射する。集光レンズ 1 7 に入射した照明光 L 2 は、集光レンズ 1 7 により屈折され、対象物 S に照射される際に光軸に略垂直な波面を有する光となり、対象物 S に照射される。

[0016] 対象物 S は、対象物 S において位相の計測を行う対象となる部分またはその近傍に対物レンズ 2 1 a の焦点位置が含まれるようにステージ 8 上に配置される。対象物 S は、特に限定されないが、照明光が対象物 S に照射され透過する際に、振幅の変化の割合は比較的小さく、一方、位相の変化の割合は大きい場合に、本実施形態に係る位相計測の効果がより顕著に得られるので

好ましい。このような物体を位相物体と呼ぶ。対象物Sとしては、上記の観点から、特に培養細胞等の細胞のような位相物体が好ましい。

[0017] ステージ8は、対物レンズ21aの光軸、および当該光軸に垂直な軸に沿って移動可能に構成されている。ここで、対物レンズ21aの光軸とは、対物レンズ21aの対象物S側のレンズ面の光学中心と対物レンズ21aの焦点を通る直線で示される軸L_o（図5参照）を指す。ステージ8は、モータ等の移動装置による電動駆動により、対象物Sを撮像する際に、対物レンズ21aの光軸L_oに沿った移動が可能に構成されている。

図5では、対物レンズ21aの光軸L_oが、顕微鏡本体部100の光軸L₁と一致している点を、L_o（L₁）と示した。

以下の実施形態では、図1に座標軸900として示すように、顕微鏡本体部100の光軸L₁、すなわち対物レンズ21aの光軸L_oに平行にz軸を取り、z軸に垂直であって紙面に平行にx軸を取り、x軸及びz軸に垂直にy軸をとる。

[0018] 対物光学系20は、対物レンズ21を含んで構成される。本実施形態では、対物レンズ21としては、複数の対物レンズ21a、対物レンズ21b、対物レンズ21cを備える。後述するように、解析システム1では、開口数NA等の異なる対物レンズ21a、対物レンズ21b、および対物レンズ21cを交換して対象物Sを撮像して、それぞれの対物レンズ21により得たデータに基づいて位相計測を行う際、得られる位相値のばらつきを抑制するように構成されている。

対物レンズ21を変更した際に計測される位相値の変化が大きいと、異なる対物レンズ21を用いて取得したデータの間の比較が難しくなる。また、異なる対物レンズ21を用いて取得したデータのうちのどの対物レンズ21を用いて取得したデータが位相を復元する際の精度が高いのか判断が難しい等の理由により、一連の測定に係る作業に負担が生じる。

[0019] 落射照明光学系110は、水銀ランプ111等を含んで構成され、蛍光観察等のための励起光を出射する。落射照明光学系110から出射した光は、

フィルターキューブ１２０に入射する。

フィルターキューブ１２０は、励起フィルター１２１と、ダイクロイックフィルター１２２と、吸収フィルター１２３とを含んで構成される。フィルターキューブ１２０は、落射照明光学系１１０から入射した光を対象物Ｓへと反射する一方、対象物Ｓからの蛍光をリレー光学系３０へと透過させる。フィルターキューブ１２０は、光路外の位置Ｐ２に適宜退避できるように構成されている。

[0020] 励起フィルター１２１は、落射照明光学系１１０から入射した励起光の波長範囲を、ダイクロイックフィルター１２２の反射波長領域にするように透過波長域が設定されている。これにより、励起フィルター１２１は、励起光の一部の波長範囲の励起光を透過させる。

ダイクロイックフィルター１２２は、励起フィルター１２１を透過した励起光を対象物Ｓに向けて反射し、対物レンズ２１ａから入射した対象物Ｓからの蛍光を吸収フィルター１２３へと透過する。

吸収フィルター１２３は、ダイクロイックフィルター１２２から入射した光のうち、対象物Ｓや光学系からの不要な散乱光を吸収し、必要な光のみをリレー光学系３０の結像レンズ３１に出射する。

[0021] リレー光学系３０の結像レンズ３１は、フィルターキューブ１２０から入射した光を検出部９に結像するように屈折させてビームスプリッター３２に出射する。

ビームスプリッター３２は、フィルターキューブ１２０から入射した光の一部を検出部９へと反射し、残りは透過させてミラー３３ａに出射する。

ミラー３３ａで反射した光は、レンズ３４ａ、ミラー３３ｂ、レンズ３４ｂ、レンズ３４ｃおよびミラー３３ｃの順で、ミラーでの反射またはレンズでの屈折を経て接眼レンズ３５に入射する。接眼レンズ３５に入射した光は接眼レンズ３５により屈折されてユーザの眼Ｅに入射して知覚される。

[0022] 検出部９は、ＣＣＤ（Ｃｈａｒｇｅ Ｃｏｕｐｌｅｄ Ｄｅｖｉｃｅ）やＣＭＯＳ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｍｅｔａｌ Ｏｘｉｄｅ Ｓｅｍ

i c o n d u c t o r) 等の撮像素子の検出器を含んで構成され、リレー光学系 30 のビームスプリッター 32 により反射された光を検出する。検出した光に対応する検出信号は不図示の A/D 変換器 (a n a l o g t o d i g i t a l c o n v e r t e r) 等により適宜 A/D 変換されて解析装置 40 に出力される。言い換えると、検出部 9 は、対象物 S の像を撮像する。

なお、解析システム 1 では、対象物 S の位相計測に際し、検出部 9 が、透過照明光学系 10 からの照明光 L2 が照射された対象物 S の像を撮像する構成にしたが、この例に限られない。例えば、落射照明光学系 110 からの照明光が照射された対象物 S の像を撮像する構成にしてもよい。この場合、落射照明光学系 110 からの照明光は、対物レンズ 21a (対物光学系 20) を介して対象物 S に照射され、対象物 S で反射した光に基づく対象物 S の像を検出部 9 で撮像する。

[0023] 図 2 は、本実施形態に係る解析システムに含まれる解析装置の構成を示した図である。解析装置 40 は、入力部 41 と、表示部 42 と、通信部 43 と、記憶部 44 と、制御部 50 とを備える。制御部 50 は、装置制御部 51 と、画像作成部 52 と、解析部 53 とを備える。装置制御部 51 は、最適条件計算部 511 を備える。画像作成部 52 は、位相復元処理部 521 と、画像構築部 522 とを備える。解析部 53 は、取得部 531 と、画像解析部 532 とを備える。

[0024] 入力部 41 は、キーボード、マウスおよび／またはタッチパネル等の入力装置により構成され、顕微鏡本体部 100 による対象物 S の撮像や画像作成部 52 による当該撮像により得られたデータの解析に必要な情報等を含む入力データを受け付ける。

対象物 S の撮像に必要な情報の一例は、計測情景に関する情報である。入力部 41 は、受け付けた入力データを、後述の記憶部 44 に適宜記憶させる。なお、入力データは、後述の通信部 43 を介して取得してもよい。

[0025] 表示部 42 は、液晶モニタ等の表示装置により構成され、顕微鏡本体部 1

00による撮像の条件、当該撮像により得られたデータに基づいて画像作成部52が生成した定量位相画像、解析部53が生成した解析結果等を表示する。

通信部43は、インターネット等の通信網を利用して通信を行う通信装置により構成され、顕微鏡本体部100による撮像の条件、当該撮像により得られたデータに基づいて画像作成部52が生成した定量位相画像、解析部53が生成した解析結果等を送信したり、適宜必要なデータを送受信したりする。

記憶部44は、不揮発性メモリ等の記憶装置により構成され、制御部50に処理を行わせるプログラム、顕微鏡本体部100による撮像に必要なデータ、当該撮像により得られたデータおよび当該データに基づいて画像作成部52が生成した定量位相画像、解析部53が生成した解析結果等を記憶する。

[0026] 制御部50は、CPU (Central Processing Unit) 等のマイクロプロセッサ等を含むプロセッサにより構成され、解析システム1を制御する動作の主体として機能する。すなわち、記憶部44等に搭載されているプログラムを実行することにより、顕微鏡本体部100による対象物Sの撮像を行う装置制御処理、当該撮像により得られたデータの位相復元処理等の画像作成処理、画像の解析処理、および出力処理等の各種処理を行う。

[0027] 制御部50の装置制御部51は、ユーザにより入力された入力データに基づいて顕微鏡本体部100による対象物Sの撮像に必要なパラメータを適宜算出するとともに、取得した当該パラメータおよび入力データ等に基づいて顕微鏡本体部100の各部の動作を制御する。

[0028] 最適条件計算部511は、顕微鏡本体部100が対象物Sにおける複数の位置のそれぞれに対物レンズ21aの焦点を順次配置して検出部9により対象物Sからの光を検出する際に設定するための、当該複数の位置の間隔 Δz を算出する。この間隔 Δz を焦点間隔と呼ぶ。焦点間隔 Δz は、精度よく位

相計測を行うために重要なパラメータである。以下、この点に関し、強度輸送方程式を利用した位相計測の方法に基づいて説明する。

[0029] 図3は、位相物体を透過した光の強度分布が変化する点を説明するための概念図である。対象物Sは、細胞等の位相物体であり、対象物Sには、波面W1、W2、W3により模式的に示されているように、互いに平行で光軸に略垂直な波面を有する平面波が照射されている。平面波の進行方向は矢印A3で示した。

対象物Sを透過した光は、振幅は大きく変化しないものの、位相が変化することにより、等位相面、すなわち波面が変化する（波面W4）。ホイヘンス＝フレネルの原理で、曲線状の波面を構成する光は、実線矢印A4で示されるように計測面i1に到達する。

[0030] ここで、後に詳述するように、一例として対物レンズ21aの焦点が配置される対象物Sにおける特定の面（言い換えると、対物レンズ21aの合焦面）を計測面i1と称する。

計測面i1は、対物レンズ21aの光軸に実質的に垂直な面である。図3では、計測面i1は平面波の波面W1～W3と実質的に平行である。計測面i1上では、上述のように対象物Sによる波面の変化に伴い所定の光の強度分布（以下、光強度分布と呼ぶ）が形成される。

対象物Sによる透過光の位相の変化と光強度分布との関係に基づいて、透過光の強度を解析することにより、位相の変化を計測する方法が提案されている。本実施形態では、一例として、強度輸送方程式を用いた方法を利用する。伝播する波動における、強度Iと位相 ϕ の関係は、強度輸送方程式により記述される。

[0031] 図4は、位相分布 ϕ の算出のために行う対象物Sからの光の検出方法を説明するための図である。まず、対象物Sの計測面i1における光強度分布および計測面i1におけるzに関する微分係数分布を得る必要がある。このため、装置制御部51は、図4に示すように、対物レンズ21aの焦点が所望の計測面i1に含まれるように設定して、結像光学系7により検出部9の検

出面に対象物 S の像を結像させて対象物 S からの光を検出部 9 に検出させる。
。

検出部 9 の各画素からの検出信号は、制御部 50（図 2）に入力され、位相復元処理部 521 により各画素の位置と検出信号に基づいた光強度とが対応付けられた光強度分布データが生成される。

[0032] 光強度分布データは、ある座標 z の値に対応する計測面上での座標（ x 、 y ）の位置に対応する、検出部 9 における各画素で検出された光の強度分布を表すデータである。光強度分布データは、当該座標 x 、 y 、 z の値に対応する光強度を示すデータであり、ルックアップテーブルの形式で構築されている。

例えば、ある z の値に対応する計測面上での光強度分布を色または階調で区別して二次元にマッピングすることにより、当該 z の位置における光の強度分布を示す画像（以下、光強度画像）を作成することができる。

なお、所定の座標 x 、 y 、 z の値に対応する光強度の値を取り出すことができれば、光強度分布データのデータ構造は特に限定されず、他の既存のデータ構造であってもよい。

[0033] 計測面 i 1 の位置（言い換えると、対物レンズ 21a の焦点位置）は、検出部 9 により検出される対象物 S からの光の光強度のコントラストに基づいた位置に設定されることが好ましい。装置制御部 51 は、事前に（本実施形態に係る位相計測の前に）取得した対象物 S の三次元の光強度分布データから算出したパラメータ（以下に示す分散 v_z 等の対象物 S からの光の光強度のコントラストを示すパラメータ）に基づいて、計測面 i 1 の位置を設定することができる。

上記三次元の光強度分布データを事前に撮像により取得する場合、この光強度分布データの取得のための撮像の際の対象物 S における焦点の位置は特に限定されず、適宜設定すればよい。

[0034] 装置制御部 51 は、事前に取得した三次元の光強度分布データについて、各 z の値に対応した、 x 方向および y 方向についての二次元の光強度分布を

$I_z(x, y)$ としたとき、各 z の値に対応する光強度分布の分散値 v_z を算出する。

装置制御部 51 は、算出した各 z の値に対応する分散 v_z に基づいて計測面 $i1$ の位置、すなわち、対物レンズ 21a の焦点位置を設定する。例えば、装置制御部 51 は、算出した分散 v_z のうち、極小となる分散 v_z に対応する z 方向の位置に計測面 $i1$ の位置を設定する。言い換えると、装置制御部 51 は、計測面 $i1$ の位置をコントラストが低い光強度分布データに対応する z の値に設置する。

[0035] 装置制御部 51 は、最適条件計算部 511 が算出した焦点間隔 Δz に基づいて、対物レンズ 21a の焦点位置が、計測面 $i1$ 上の位置から z 軸に沿って $-\Delta z$ および $+\Delta z$ の距離ずれたそれぞれの位置となるように計測面 $i2$ および計測面 $i3$ 上に当該焦点位置を順次設定する。装置制御部 51 は、これらの計測面 $i2$ および計測面 $i3$ にそれぞれ対物レンズ 21a の焦点を配置した際に、結像光学系 7 により検出部 9 の検出面に対象物 S の像を結像させて対象物 S からの光を検出部 9 に検出させる。

計測面 $i2$ および計測面 $i3$ に対物レンズ 21a の焦点を配置したそれぞれの場合に対応する検出部 9 の各画素からの検出信号は、制御部 50 (図 2) に入力され、位相復元処理部 521 により各画素の位置と検出信号に基づいた光強度とが対応付けられた光強度分布データがそれぞれ生成される。

なお、計測面 $i1 \sim$ 計測面 $i3$ 上に配置される、それぞれの対物レンズ 21a の焦点の位置は、それぞれ計測面 $i1 \sim$ 計測面 $i3$ 上に存在すれば、XY 平面上の位置は特に限定されない。

[0036] 生成された計測面 $i2$ と計測面 $i3$ のそれぞれの計測面に対応するそれぞれの光強度分布データは、計測面 $i1$ における光強度の z に関する微分係数を算出するのに用いられる。

位相復元処理部 521 は、計測面 $i2$ 上の点および計測面 $i3$ 上の点であって、XY 平面上での座標が同じ位置等の互いに対応する位置にある 2 点の強度の値の差分を、計測面 $i2$ および計測面 $i3$ の間の距離である $2\Delta z$ で

割ることにより、計測面 $i-1$ における光強度の z に関する微分係数に相当する $dI/dz = (I_3 - I_2) / 2 \Delta z$ を算出する。

位相復元処理部 521 は、算出された光強度の z に関する微分係数分布に対応するデータ（以下、微分係数分布データと呼ぶ）を適宜記憶部 44 等に記憶させる。微分係数分布データは、座標 x 、 y 、 z の値に対応する光強度の z に関する微分係数の分布を示すデータであり、ルックアップテーブルの形式で構築されている。

なお、所定の座標 x 、 y 、 z の値に対応する z に関する微分係数の値を取り出すことができれば、微分係数分布データのデータ構造は特に限定されず、他の既存のデータ構造であってもよい。

[0037] 図 5 は、対象物 S を撮像する際の対物レンズ 21a の焦点と計測面 $i-1$ ～計測面 $i-3$ の配置例を示す。図 5 では、ステージ 8 上に対象物 S が載置されている。図 5 では、対物レンズ 21a の光軸 L_0 に平行に z 軸が設定され、対象物 S から対物レンズ 21a へ向かう向きを z 軸のプラス（+）の向きとしている。また、焦点位置 F から対物レンズ 21a に入射する光の光束を二点鎖線 L_{200} で模式的に示した。図 5 では、対物レンズ 21a の焦点位置 F を $z = z_0$ とし、 $z = z_0$ の点を含んで z 軸に垂直な面を計測面 $i-1$ として示している。

[0038] 装置制御部 51 は、モータ等の移動装置を介して電動駆動することによりステージ 8 を移動させ、計測面 $i-1$ 、計測面 $i-2$ 、計測面 $i-3$ 上にそれぞれ対物レンズ 21a の焦点位置を設定する。装置制御部 51 は、対物レンズ 21a の光軸 L_0 に沿って互いに焦点間隔 Δz 離れた複数の位置のそれぞれに対物レンズ 21a の焦点を順次配置する。

ここで、「対物レンズ 21a の光軸 L_0 に沿って互いに焦点間隔 Δz 離れた複数の位置」とは、当該複数の位置を対物レンズ 21a の光軸 L_0 に射影した際に、互いに Δz の距離離れる複数の位置を指す。また、対物レンズ 21a は結像光学系 7 においてステージ 8 側にあるため、対物レンズ 21a の焦点位置 F は対物光学系 20 または結像光学系 7 の焦点位置と言い換えるこ

ともできる。

[0039] 装置制御部 51 の最適条件計算部 511 は、本実施形態における顕微鏡本体部 100 の設定情報と後に詳述するパラメータ k とを用い、焦点間隔 Δz を算出する。ここで、顕微鏡本体部 100 の設定情報とは、定量位相画像の生成のために顕微鏡本体部 100 に設定される情報であり、例えば、対物レンズ 21a の開口数、照明光 L2 の波長、対物レンズ 21a と対象物 S との間の屈折率の情報である。

装置制御部 51 は、対物レンズ 21a が乾燥対物レンズの場合、対物レンズ 21a と対象物 S との間の雰囲気は空気であるため、空気の屈折率として例えば $n = 1.00$ に設定する。一方、対物レンズ 21a が液浸対物レンズの場合、装置制御部 51 は、対物レンズ 21a と対象物 S との間に満たされる浸液の屈折率を屈折率 n として設定する。

NA は対物レンズ 21a の開口数であり、入力部 41 へのユーザの入力等に基づいて装置制御部 51 が設定する。そして、最適条件計算部 511 は、顕微鏡本体部 100 の設定情報に基づいて、焦点間隔 Δz を算出する。具体的には、最適条件計算部 511 は、対物レンズ 21a の開口数 NA、照明光 L2 の波長 λ 、および対物レンズ 21a と対象物 S との間の屈折率 n の情報に基づいて焦点間隔 Δz を算出する。

[0040] また、パラメータ k は 1 以上の値であり、 $k = 1$ の場合には、対物レンズ 21a の性能を最大限に生かす遮断空間周波数まで、強度輸送方程式により位相復元を行うことができる。 k の値が 1 より大きくなるに従って、強度輸送方程式により位相復元を行うことができる空間周波数は低くなる。以下では、パラメータ k を位相復元パラメータと呼ぶ。

なお、対象物 S の実際の位相値と測定した位相値との差を位相復元誤差と称する。高い空間周波数で位相を復元すると、基本的に位相復元誤差が小さくなる。位相復元誤差が小さい場合には、実際の位相値により近い位相を（つまり、より高精度に位相を）復元することになるので、位相を復元する際の精度（位相復元精度と称する）が高いと言うことができる。

[0041] 最適条件計算部511は、位相復元パラメータ k を、25以下に設定することが好ましく、16以下に設定することがより好ましい。位相復元パラメータ k が大きくなると、上記の通り、位相復元可能な空間周波数が低くなる。 $k=25$ の場合における焦点間隔 Δz を採用した場合には、対物レンズ21aの遮断空間周波数の5分の1の空間周波数まで復元することに相当する性能となる。

また、 $k=16$ の場合における焦点間隔 Δz を採用した場合には、対物レンズ21aの遮断空間周波数の4分の1の空間周波数まで復元することに相当する性能となる。可視光での数 μm ～数百 μm 程度の大きさの細胞等の対象物S（位相物体）の観察では、位相復元パラメータ k は25以下の比較的大きい値に設定すると細胞全体を検出する上で好ましく、パラメータ k が16以下だと、核等の細胞内の比較的大きい構造物を検出しやすくなるためさらに好ましい。

なお、上記の例においては、対物レンズ21aの遮断空間周波数の5分の1や4分の1の空間周波数まで復元することに相当するようにパラメータ k の値を決定したが、パラメータ k の値はこれらの値に限られることはなく、対象物Sの位相計測に必要な分解能に応じて設定すればよい。

[0042] なお、最適条件計算部511は、対物レンズ21aによる点像強度分布（Point Spread Function: PSF）に基づいて焦点間隔 Δz を設定してもよい。最適条件計算部511は、一例として、当該点像強度分布（PSF）の第一暗環の位置を基準とした場合の k の値である $k=5$ の条件に基づき、 k が5以下の範囲として焦点間隔 Δz を設定することができる。

一例として、最適条件計算部511は、上述したように、対物レンズ21aの遮断空間周波数まで位相復元が可能となる条件（ $k=1$ ）を加え、 k が1以上5以下の範囲として焦点間隔 Δz を設定してもよい。

最適条件計算部511は、焦点間隔 Δz を焦点位置Fと第一暗環の位置との間の距離に基づいて設定することで、高い空間周波数まで精度よく位相復

元を行うことができる。対物レンズ21を交換する場合に、位相復元パラメータ k を一定にしながら、対物レンズ21の開口数 NA 等に合わせて焦点間隔 Δz を変更することで、位相復元する際の位相値を略一定に保つことができる。

例えば対物レンズ21の開口数 NA が0.3のときに位相復元できる周波数領域に対応する大きさの細胞構造等は、開口数 NA が0.75または0.95である対物レンズ21へと交換する際にも、同じ位相値として算出される。従って、同じ対象物 S に対して対物レンズ21を切り替えても位相復元した結果得られた位相のばらつきは小さくなり、対象物 S の定量的な解析が可能となる。

[0043] 上述のように、焦点間隔 Δz の値を調節することにより位相を復元する際の精度を高くすることができるが、位相を復元する際の精度は、焦点間隔 Δz の他、対象物 S 上のサンプリング間隔を調節することによって高くすることができる。

図6は、サンプリング間隔を説明するための図である。図3を参照して上述した通り、対象物 S を透過して非平面となった波面 $W4$ は、計測面 $i1$ ～計測面 $i3$ （以下、計測面 $i1$ ～計測面 $i3$ を総称して計測面 i と呼ぶ）に位相の変化に基づいた光強度分布を形成する。図6の右側の図は、計測面 i を対物レンズ21aの光学中心から見た概念図で、検出部9の個々の画素に対応する部分 G を示した。

個々の画素に対応する部分 G は、対象物 S に対応する領域を格子状に覆うように配列される。以下の実施形態で、サンプリング間隔 Δx 、 Δy は、このように対物レンズ21aの焦点位置が設定された計測面 i における個々の画素に対応する部分 G の幅である。

[0044] サンプリング間隔 Δx 、 Δy は、検出部9の画素サイズを P 、結像光学系7の横倍率を β としたとき、 $\Delta x = \Delta y = P / \beta$ となる。ここで、検出部9の画素サイズとは、CCD等の場合、各画素の幅を示し、変形例6で後述するレーザ走査型蛍光観察ユニットを用いた走査型顕微鏡の場合、画素サイズ

Pは、視野数（対角）をスキャン倍率で割ったサイズである。以下では、サンプリング間隔を Δx として記述する。結像光学系7の横倍率 β は、対物レンズ21aの倍率 β_1 とリレー光学系30の倍率 β_2 との積となる。

[0045] 図7（A）は、サンプリング間隔 Δx の設定方法を示す概念図である。最適条件計算部511は、点像強度分布（PSF）のエアリーディスクの大きさに基づいて結像光学系7の倍率 β を設定する。図7（A）では、検出部9の検出面上に投影される点像強度分布（PSF）のエアリーディスクの直径幅が、画素サイズPの幅と等しい場合の図を模式的に示した。最適条件計算部511は、検出部9の検出面上に投影される点像強度分布（PSF）のエアリーディスクの直径が、画素サイズPの幅よりも大きくなるように結像光学系7の倍率 β を設定することが好ましい。

あるいは、最適条件計算部511は、検出部9の検出面上に投影される点像強度分布（PSF）のエアリーディスクの面積が、画素サイズPの面積よりも大きくなるように結像光学系7の倍率 β を設定することが好ましい。この場合、サンプリング間隔 $\Delta x = P / \beta$ は照明光の波長 λ および対物レンズ21aの開口数NAに基づいて設定されることになる。

[0046] 図7（B）は、サンプリング間隔 Δx の設定方法を示す概念図である。最適条件計算部511は、検出部9の検出面上に投影される点像強度分布（PSF）のエアリーディスクの面積が、画素サイズPの面積の4倍～5倍になるように結像光学系7の倍率 β を設定することが特に好ましい。これにより、光強度分布 I_1 、 I_2 、 I_3 のノイズによる位相を復元する際の精度の低下をより一層抑制することができる。

最適条件計算部511が、上述のように対物レンズ21aの焦点を配置する位置の数および焦点間隔 Δz を設定したら、装置制御部51は、設定された対物レンズ21aの焦点を配置する位置の数および焦点間隔 Δz に基づいて対象物Sの撮像を行う。対象物Sからの光を検出部9が検出して得られた検出信号は、画像作成部52の位相復元処理部521（図2）に入力される。

[0047] 画像作成部52は、検出部9から入力された検出信号を処理する。画像作成部52は、当該検出信号から光強度分布データを生成し、この光強度分布データに基づいて定量位相画像を生成する画像生成部として機能する。また、解析部53は、光強度分布データに基づいて復元した対象物Sの位相に基づいて解析を行う。

画像作成部52の位相復元処理部521は、検出部9の各画素の位置と、入力された検出信号に基づいた光強度とが対応付けられた光強度分布データを生成し、適宜、記憶部44等に記憶させる。位相復元処理部521は、強度輸送方程式および最適条件計算部511が設定した焦点間隔 Δz 等に基づいて、生成した光強度分布データから計測面 i 1等を含む対象物Sにおける位相分布 ϕ に対応するデータ（以下、位相分布データと呼ぶ）を生成し、適宜記憶部44等に記憶させる。位相分布データの一例は、座標 x 、 y 、 z の値に位相が対応付けられているデータであり、ルックアップテーブルの形式で構築されている。

なお、所定の座標 x 、 y 、 z の値に対応する位相値を取り出すことができれば、位相分布データのデータ構造は特に限定されず、他の既存のデータ構造であってもよい。

[0048] 最適条件計算部511が対物レンズ21aの焦点を配置する位置の数を、3を超える値に設定した場合は、位相復元処理部521は、Savitzky-Golay法（以下、SG法と呼ぶ）を用いて光強度分布データから位相を復元することが好ましい。

画像構築部522（図2）は、位相復元処理部521が生成した位相分布データに基づいて、2次元または3次元の定量位相画像を構築し、記憶部44等に記憶させる。ここで、定量位相画像とは、対象物における厚さの変化と屈折率の変化を積とする位相を表す（画像化）した画像である。

[0049] 具体的には、一例として、定量位相画像は、強度輸送方程式で算出した位相値に応じて階調値を設定した画像である。定量位相画像は、一例として、位相値の大きさに比例した階調のグレースケールを設定した画像である。こ

の場合、定量位相画像では、階調値（位相値の大小）から対象物 S の z 方向の厚さ（高さ）についての高低情報を視認することができる。

さらに、画像構築部 522 は、当該位相分布データまたは定量位相画像、および光強度分布 I_1 、 I_2 、 I_3 に基づいて、位相差画像等を構築する。以下では、画像構築部 522 による計算処理によって得られる位相差画像を、定量位相画像と呼ぶ。なお、定量位相画像は、強度輸送方程式で算出された位相値に応じて階調値を設定した画像に限られず、既存の他の方法で算出した位相値に応じて階調値を設定した画像であってもよい。

[0050] 取得部 531 は、画像作成部 52 が作成した定量位相画像を取得する。定量位相画像の一例は、複数の培養細胞の画像を含む。培養細胞の死細胞数を増やすために、グルコースフリー培地にて CHO (Chinese Hamster Ovary) - S 細胞を培養した。培地内にグルコースが存在しないために、細胞は飢餓状態となり、比較的短時間で死細胞数を増加させることができる。

[0051] 次に細胞観察に使用した容器について説明する。

図 8 A は、容器の例 1 を示す図である。評価する細胞は浮遊細胞であるため、96 ウェルプレートのような容器では時間が経過すると細胞の沈降が生じてしまう。また細胞が培地の深さ方向（光軸方向）に広く分布してしまい、焦点位置が定まりにくい問題が生じ観察には好ましくない。そこで厚さ $30\mu\text{m}$ の黒色両面テープ TA に $\phi 15\text{mm}$ の開口を設けたものをスライドガラス SG に貼り付けた。 $\phi 15\text{mm}$ の開口部に細胞懸濁液（細胞と培地とが混ざったもの）を滴下し、上部からカバーガラス CG で蓋をすることにより、細胞懸濁液の液層が $30\mu\text{m}$ となる容器ができあがる。

図 8 B は、容器の例 2 を示す図である。図 8 B において、(1) は従来の容器（例えば 96 ウェルプレートなど）であり、(2) は図 8 B の (1) の容器よりさらに薄い薄層の容器（薄層セル）である。

図 8 A に示す薄層の容器によれば、スライドガラス SG とカバーガラス CG との間の厚さが薄いため、細胞の沈降の影響が少ない（1 日放置しても焦

点位置変化なし) ことと、観察光学系(対物レンズ)の合焦範囲に滞在する細胞数が増えることなどの利点がある。図8Bに示す(2)の薄層セルで浮遊細胞を観察することにより、収容部の厚さによって長時間の観察でも細胞の沈降が生じにくい、また焦点位置に滞在する細胞数を増やすことができるため、良好な観察が可能となる。なお、図8Bの(1)、(2)とも、収容部は細胞懸濁液の培地の上下面のスライドガラスSG、カバーガラスCGは省略してある。

[0052] 細胞は浮遊化したCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いた。細胞培地としてグルコースフリー培地で18時間培養することにより、比較的短時間で細胞生存率を低下させることができた。

グルコースフリー培地で培養した細胞懸濁液をマイクロテストチューブに10 μ L取り分けた。次に細胞の生死判定に広く使用される0.5%トリパンブルー染色液を10 μ L取り分けて細胞懸濁液が入ったマイクロテストチューブに滴下してピペティングを行った。更に細胞懸濁液およびトリパンブルー染色液が混ざったマイクロテストチューブから5.3 μ L分注し、図8Aに示す薄層観察容器に滴下した後、カバーガラスで蓋をして、ステージ8に配置した。

顕微鏡本体部100を用いて、20 $\times$ 対物レンズ(NA0.45)、ズーム倍率1.5 $\times$ 、白色LED(light emitting diode)光源を透過照明として明視野観察を行った。定量位相画像生成のために焦点位置の画像に加えて、焦点位置から前後5 μ m光軸方向にずれた画像を3枚取得した。焦点画像とその前後 ΔZ 位置が異なる3枚の明視野画像を取得することにより、定量位相画像を構築する。

図9は、明視野画像の一例を示す図である。図9は、焦点位置での明視野画像を示し、個々の細胞を区別するために番号が付与されている。図9で黒く染まっている細胞はトリパンブルーによって染色された死細胞である。

図10は、定量位相画像の一例を示す図である。図10は、図9の明視野画像と焦点位置から前後5 μ m離れた画像から構築された定量位相画像を示

す。図10によれば、輝度値の異なる細胞画像が観察される。図10には、図9において、「2」、「3」、「5」、「6」、「7」、「10」、「16」に該当する死細胞が観察される。図2に戻り説明を続ける。

画像解析部532は、取得部531から定量位相画像を取得する。画像解析部532は、取得した定量位相画像に含まれる生細胞の中の培地と細胞内との屈折率差(Δn)を導出する。

[0053] 定量位相画像から細胞と培地との屈折率差を算出する手法について説明する。

細胞と培地との屈折率差を算出するには細胞径情報が必要となる。ここでは一例として、細胞面積から細胞径を算出する手法を採用した場合について説明を続ける。

$$\text{細胞径} = 2 \times \sqrt{(\text{細胞面積} / \pi)} \quad (1)$$

観測した細胞画像が円から乖離すると細胞径が正確に求まらない。そのため、真円度の高い細胞を選択している。細胞径の導出方法は、式(1)以外の手法でも算出可能であるため、真円度閾値の決定は必須ではない。ここで使用している細胞は浮遊細胞であるため、その多くは培地中で球状となる。

次に定量位相画像を2値化して細胞体マスクを生成した。また観察画像によっては画像のエッジ部に細胞がまたがった状態で観測される場合がある。その場合、細胞径を正確に求めることはできないため、画像エッジ部に存在する細胞体マスクは除外するようにしている。こうして得られた細胞体マスクに対して、それぞれ真円度を求め、予め決定される真円度閾値以上の細胞体マスクの面積から(1)に従って細胞径を算出する。

[0054] 次に図10の定量位相画像に生成した細胞体マスクを重ね、細胞体マスクの範囲で検出された細胞体に対して、定量位相画像の最大輝度値を求める。最大輝度値に限らず細胞体マスク内の定量位相画像の積分値を求めてもよい。次に得られた最大輝度値を細胞径で除算することで細胞と培地との屈折率差情報を算出する。定量位相画像の輝度値は位相量を示している。位相量は、式(2)で表現される。

$$\text{位相量} = (2 \times \pi \times \Delta n \times \text{細胞厚}) / \lambda \quad (2)$$

ここで λ は観測波長、 Δn は細胞と培地の屈折率差である。よって定量位相画像に現れる細胞マスク内の最大輝度値を細胞径（細胞厚）で除算することで細胞と培地の屈折率差情報を得ることができる。

図11は、本実施形態に係る解析システムの定量位相解析結果の一例を示す図である。図11に示すヒストグラムにおいて、横軸は屈折率差（ Δn ）などの階級であり、縦軸はCountなどの度数である。また、図11には図9の細胞体番号に対応する番号が付されている。

図11によれば、屈折率差（ Δn ）が400前後でヒストグラムが分断され、屈折率差（ Δn ）が大きな集団と小さな集団とに分かれていることがわかる。画像解析部532は、定量位相解析結果に基づいて、細胞の生死を判定するための屈折率差の閾値（以下「生死判定閾値」という）を決定する。

具体的には、明視野画像を最低3枚（焦点画像、前焦点画像、後焦点画像）撮影し、各画像内の画素輝度変化から定量位相画像を構築する。定量位相画像の輝度値は細胞厚×（細胞内と培地の屈折率差）に比例した情報を持っている。タンパク質やその構成要素であるアミノ酸は水と比較すると高いモル屈折率を有している。細胞内にタンパク質やその構成要素であるアミノ酸が多いと定量位相画像の輝度値は高く、その細胞は活性化していると考えることができ、抗体生産能力も高いと推測される。

[0055] 生細胞と死細胞とが屈折率差（ Δn ）の生死判定閾値によって分離できることについて説明する。

定量位相画像の輝度値は位相量に比例し、その大きさは細胞と培地の屈折率差と細胞厚みの積で示される。位相分布の輝度値を細胞の厚みで除算することによって、細胞と培地との屈折率差（ Δn ）成分のみに注目する。

図12は、培地と細胞内との屈折率差を説明するための図である。細胞内の位相が大きい場合と、細胞内の位相が中である場合と、細胞内の位相が小である場合とについて説明する。

図12の左図に示すように、細胞内の位相が大きい場合には、細胞CEの

恒常性を維持する細胞膜が壊れていないため、培地と細胞内の屈折率差が大きくなる。図 1 2 の真ん中の図に示すように、細胞内の位相が中である場合には、細胞が弱ってくると、細胞 C E の恒常性を維持できなくなり、細胞膜が部分的に壊れていく。細胞膜が壊れると、培地成分が細胞内に浸透することになる。培地成分の屈折率は細胞内の屈折率と比較すると値が小さいため（ほぼ水の屈折率と同程度）、細胞膜が壊れて培地が細胞内に浸透することで細胞内の屈折率が低下していく。このため、培地と細胞内の屈折率差が中となる。図 1 2 の右図に示すように、細胞内の位相が小である場合には、細胞 C E の恒常性を維持する細胞膜が壊れてしまうため、培地と細胞内の屈折率差が小さくなる。完全に細胞膜が壊れ、培地が細胞内に入り込むと屈折率差 Δn はゼロとなる。これが生細胞と死細胞を区別する機構となっている。

[0056] 画像解析部 5 3 2 は、定量位相画像を 2 値化して、細胞体マスクを生成する。画像解析部 5 3 2 は、細胞体マスクと明視野画像とを比較し、細胞体マスクが明視野画像の細胞体の輪郭と一致する 2 値化閾値を決定する。

図 1 3 は、2 値化閾値の決定方法を説明するための図である。図 1 3 において、左図は 2 値化閾値 5 0 0 で生成した細胞体マスクと明視野画像とを重ね合わせた画像を示し、真ん中の図は 2 値化閾値 7 5 0 で生成した細胞体マスクと明視野画像とを重ね合わせた画像を示し、右図は 2 値化閾値 1 0 0 0 で生成した細胞体マスクと明視野画像とを重ね合わせた画像を示す。

図 1 3 によれば、2 値化閾値 5 0 0 および 2 値化閾値 7 5 0 で生成した細胞体マスクは、細胞の外周に隙間が見られる。2 値化閾値 1 0 0 0 で生成した細胞体マスクは、細胞の外周に隙間が見られない。この場合、2 値化閾値 1 0 0 0 に決定する。

画像解析部 5 3 2 は、隣接する細胞体マスクを分割する。画像解析部 5 3 2 は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外する。画像解析部 5 3 2 は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外した残りの一又は複数の細胞体マスクの各々について、細胞体マスクの真円度を導出する

。画像解析部532は、導出した一又は複数の細胞体マスクの各々の真円度に基づいて、真円度が真円度閾値以上の細胞体マスクを抽出する。真円度閾値の一例は、0.8である。

画像解析部532は、抽出した一又は複数の細胞体マスクの各々の細胞径を算出する。例えば、画像解析部532は、細胞径を、細胞径 = $2 \times \sqrt{\text{細胞体マスクの面積} / \pi}$ （細胞体マスクの面積 / π ）によって算出する。

画像解析部532は、定量位相画像に含まれる細胞の画像に、細胞体マスクを当てる（重ねる）ことによって、細胞体マスク内（細胞体マスクの範囲）の最大輝度値を算出する。

[0057] 画像解析部532は、算出した細胞体マスク内の最大輝度値と細胞径とに基づいて、最大輝度値を細胞径で除算することによって、細胞内と培地との屈折率差 Δn を算出する。画像解析部532は、算出した屈折率差 Δn を横軸とし、Countを縦軸とするヒストグラムを作成する。

画像解析部532は、作成したヒストグラムに基づいて、生死判定閾値を決定する。図11に示される定量位相解析結果が得られた場合に、画像解析部532は、生死判定閾値を、屈折率差（ Δn ）が大きな集団と小さな集団との境界付近である屈折率差 Δn を400付近に決定する。画像解析部532は、決定した生死判定閾値に基づいて、生細胞と死細胞とのいずれか一方又は両方を計数する。

また、画像解析部532は、細胞の生存状態を解析するため、生細胞の計数結果と死細胞の計数結果とに基づいて、生存率と、生細胞密度とを導出する。具体的には、画像解析部532は、生細胞の計数結果を、式（3）によって生存率を導出してよい。

$$\text{生存率} [\%] = 100 \times (\text{生細胞数}) / (\text{観測された細胞数}) \quad (3)$$

図11に示される例では、生存率は56%と求められる。

画像解析部532は、生細胞の計数結果に基づいて生細胞密度を導出する。例えば、画像解析部532は、式（4）によって生細胞密度を導出してよい。

よい。

生細胞密度 $[cells/mL] = (\text{生細胞数}) / (\text{観測視野容量})$

(4)

以上は一枚の定量位相画像中に観測された細胞からの算出する場合について説明したが、この例に限られない。例えば、撮影位置を変更して複数箇所の撮影を行い、複数の定量位相画像を使用するようにしてもよい。複数の定量位相画像を使用することにより多くの細胞数をカウントすることができ、生細胞密度や生存率の精度を高めることができる。

[0058] (解析システムの動作)

図14は、本実施形態に係る解析システムの動作の例1を示すフローチャートである。図14を参照して定量位相画像生成方法について説明する。

(ステップS1-1)

顕微鏡本体部100において、ステージ8上に対象物が載置される。対象物の一例は、複数の培養細胞である。

(ステップS2-1)

解析装置40において、入力部41に計測条件に関する情報が入力される。

(ステップS3-1)

解析装置40において、制御部50は、ユーザが入力した情報を取得する。制御部50において、装置制御部51は、ユーザにより入力された入力データに基づいて顕微鏡本体部100による対象物Sの撮像に必要なパラメータを適宜算出することによって、パラメータを取得する。パラメータの一例は、(I)照明光の波長、(II)対物レンズの開口数、(III)対物レンズと対象物との間の屈折率、(IV)結像光学系の横倍率、(V)検出部9の画素サイズおよび(VI)位相復元パラメータである。

(ステップS4-1)

解析装置40において、最適条件計算部511は、取得したパラメータに基づいて、焦点間隔 Δz を算出する。

[0059] (ステップS 5 - 1)

解析装置40において、最適条件計算部511は、算出した焦点間隔 Δz に基づいて、対物レンズの焦点を配置する位置の数を算出する。

(ステップS 6 - 1)

解析装置40において、装置制御部51は、XYステージを駆動させ、合焦面の位置を設定する。

(ステップS 7 - 1)

解析装置40において、画像作成部52は、ステップS 3 - 1で取得した(Ⅰ)から(ⅤⅠ)のパラメータ、ステップS 5 - 1で算出した焦点間隔および対物レンズの焦点位置を配置する位置の数、並びに設定した合焦面の位置に基づいて対象物の撮像を行い、対象物の計測面における光強度分布データを生成する。画像作成部52は、計測面i 2およびi 3にそれぞれ対物レンズ21aの焦点を配置した際に、結像光学系7により検出部9の検出面に対象物Sの像を結像させて対象物Sからの光を検出部9に検出させる。

計測面i 2およびi 3に対物レンズ21aの焦点を配置したそれぞれの場合に対応する検出部9の各画素からの検出信号は、制御部50に入力され、画像作成部52により各画素の位置と検出信号に基づいた光強度とが対応付けられた光強度分布データがそれぞれ生成される。

[0060] (ステップS 8 - 1)

解析装置40において、位相復元処理部521は、検出部9の各画素の位置と、入力された検出信号に基づいた光強度とが対応付けられた光強度分布データを生成することによって、撮像により取得した光強度分布データを前処理する。

(ステップS 9 - 1)

解析装置40において、位相復元処理部521は、計測面i 2上の点および計測面i 3上の点であって、XY平面上での座標が同じ位置等の互いに対応する位置にある2点の強度の値の差分を、計測面i 2および計測面i 3の間の距離である $2\Delta z$ で割ることにより、計測面i 1における光強度の z に

関する微分係数に相当する $dI/dz = (I_3 - I_2) / 2 \Delta z$ を算出する。

[0061] (ステップS10-1)

解析装置40において、位相復元処理部521は、強度輸送方程式および最適条件計算部511が設定した焦点間隔 Δz 等に基づいて、生成した光強度分布データから計測面i1等を含む対象物Sにおける位相分布 ϕ に対応する位相分布データを生成する。

(ステップS11-1)

解析装置40において、画像構築部522は、位相復元処理部521が生成した位相分布データに基づいて、2次元または3次元の定量位相画像を生成し、生成した定量位相画像を記憶部44に保存する。

図14に示されるフローチャートにおいて、ステップS1-1の前に、撮影枚数を決定する処理が追加されてもよい。例えば、撮影枚数は、以下のように行われてもよい。観測対象物は、培養液容量800[mL]内で培養されている。培養槽内の溶液を一部採取し、セルカウンターにて生細胞数を評価したところ、 $5E+7$ [cells/mL]であった。よって、培養槽内の生細胞数は $4E+10$ と推定される。要求精度3%、信頼率99%で必要な標本数を見積もると1844 [cells]となる。

[0062] 一方、対象物観測用のセルは $\phi 15$ [mm]、厚さ0.030 [mm]であるため、細胞濃度を $5E+7$ [cells/mL]とした場合、セル内の細胞数は $3.09E+5$ [cells]と計算される。ズーム比1.5、倍率20の観測視野は0.391 [mm]であるため、視野内の細胞数は268個と計算される。よって、撮影枚数は $1844 / 268 = 7$ 枚と求められ、異なる7つの位置における観測視野中の細胞を解析することで培養槽内の細胞状態を評価できる。

撮影枚数を決定する処理が追加された場合に、ステップS11-1の後に撮影枚数に達したか否かを判定する処理が追加される。撮影枚数に達したと判定された場合には終了し、撮影枚数に達していないと判定された場合には

ステップS 6－1へ移行する。

[0063] 図15は、本実施形態に係る解析システムの動作の例2を示すフローチャートである。図15を参照して屈折率差(Δn)のヒストグラムを生成する方法について説明する。

(ステップS 1－2)

解析装置40において、画像解析部532は、真円度閾値を決定する。

(ステップS 2－2)

解析装置40において、画像解析部532は、定量位相画像閾値を決定し、定量位相画像を2値化した結果に基づいて細胞体マスクを生成する。

(ステップS 3－2)

解析装置40において、画像解析部532は、定量位相画像を2値化した結果に基づいて、隣接する細胞体マスクを分割する。

[0064] (ステップS 4－2)

解析装置40において、画像解析部532は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外する。

(ステップS 5－2)

解析装置40において、画像解析部532は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外した残りの一又は複数の細胞体マスクの各々について、細胞体マスクの真円度を導出する。

[0065] (ステップS 6－2)

解析装置40において、画像解析部532は、導出した一又は複数の細胞体マスクの各々の真円度に基づいて、真円度が真円度閾値以上の細胞体マスクを抽出する。

(ステップS 7－2)

解析装置40において、画像解析部532は、抽出した一又は複数の細胞体マスクの各々の細胞径を算出する。

(ステップS 8－2)

解析装置40において、画像解析部532は、定量位相画像に含まれる細胞の画像に、細胞体マスクを重ねることによって、細胞体マスク内の最大輝度値を算出する。

[0066] (ステップS9-2)

解析装置40において、画像解析部532は、算出した細胞体マスク内の最大輝度値と細胞径とに基づいて、最大輝度値を細胞径で除算することによって、細胞内と培地との屈折率差 Δn を算出する。

(ステップS10-2)

解析装置40において、画像解析部532は、算出した屈折率差 Δn を横軸とし、Countを縦軸とするヒストグラムを作成する。

[0067] 図16は、本実施形態に係る解析システムの動作の例3を示すフローチャートである。図16を参照して非侵襲的に細胞の生存率を算出する方法について説明する。

(ステップS1-3)

培養細胞が抽出される。培養細胞の一例は、複数の培養細胞である。

(ステップS2-3)

定量位相画像生成フローが実行される。定量位相画像生成フローについては、図14を参照して説明したのでここでの説明は省略する。

(ステップS3-2)

細胞と培地との屈折率差算出フローが実行される。細胞と培地との屈折率差算出フローについては、図15を参照して説明したのでここでの説明は省略する。

(ステップS4-3)

解析装置40において、画像解析部532は、作成したヒストグラムに基づいて、生死判定閾値を決定する。

[0068] (ステップS5-3)

解析装置40において、画像解析部532は、細胞の生存状態を解析するため、決定した生死判定閾値に基づいて、生存率と、生細胞密度とを導出す

る。

(ステップS6-3)

解析装置40において、画像解析部532は、細胞の生存状態を示す解析結果を出力する。解析結果の一例は、生細胞数、死細胞数、生存率、生細胞密度[cells/mL]、細胞径分布、平均細胞径、最大細胞径、最小細胞径、真円度分布、平均真円度、最大真円度、最小真円度である。画像解析部532は、生細胞数、死細胞数、生存率、生細胞密度、細胞径分布、平均細胞径、最大細胞径、最小細胞径、真円度分布、平均真円度、最大真円度、最小真円度を導出し、生細胞数、死細胞数、生存率、生細胞密度、細胞径分布、平均細胞径、最大細胞径、最小細胞径、真円度分布、平均真円度、最大真円度、最小真円度の導出結果を出力する。

[0069] 前述した実施形態では、画像解析部532は、定量位相画像に含まれる細胞の画像に、細胞体マスクを当てる（重ねる）ことによって、細胞体マスク内（細胞体マスクの範囲）の最大輝度値を算出する場合について説明したが、この例に限られない。例えば、画像解析部532は、定量位相画像に含まれる細胞の画像に、細胞体マスクを当てる（重ねる）ことによって、細胞体マスク内の輝度値の積分値を算出するようにしてもよい。その後、最大輝度値の代わりに輝度値の積分値を使用して処理が行われる。

前述した実施形態では、定量位相画像を生成する方式の一例として、強度輸送方程式を原理とした手法を適用する場合について説明したが、この例に限られない。例えば、定量位相画像を生成する方式として、干渉を用いた手法を適用してもよい。強度輸送方程式を原理とした手法を適用することによって、干渉方式と比較して、位相アンラッピングを行う必要がない、位相物体に加えて、振幅物体(細胞が染色されて不透明な状態のもの)にも適用可能である。

[0070] 前述した実施形態において、時系列に非侵襲的に細胞の生死判定を行ってもよい。解析装置40において、画像解析部532は、前述した解析結果に加えて、生存率の時間経過推移を含む培養期間によって細胞の形態やその数

がどのように推移していくかを示した情報も表示してもよい。

図17は、本実施形態の解析システムに含まれる解析装置が表示する解析結果の一例を示す概念図である。図17に示すように、表示部42は、細胞画像と、結果出力パラメータ（解析結果）と、細胞生存率推移曲線と、ヒストグラムとを表示する。

前述した実施形態において、画像解析部532は、屈折率差 Δn に基づいて、所定の細胞を探索するようにしてもよい。屈折率差 Δn によって細胞の活性化状態を判定できるため、画像解析部532は、屈折率差 Δn の高い集団は優良細胞株と見做すことができる。例えば、画像解析部532は、優良細胞株を探索するようにしてもよいし、細胞株開発（Cell Line Development）への適用も可能である。

[0071] 本実施形態に係る解析システム1によれば、解析システム1は、複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得する取得部531と、細胞画像に含まれる複数の培養細胞と培地との屈折率差を導出し、屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、細胞画像に含まれる複数の培養細胞について、培養細胞の生存率と培養細胞中の生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出する画像解析部532とを備える

このように構成することによって、細胞を生きたまま無染色、非侵襲、リアルタイムで観察できる（蛍光染色と同等の観察が可能）。個々の細胞をセグメンテーションできる。細胞のモルフォロジー（厚み、表面積、体積など）を定量的に解析できる。インラインで、且つ非侵襲的な死細胞の評価ができる。

[0072] 解析システム1において、取得部531は細胞画像の光強度分布データに基づき定量位相画像を取得し、画像解析部532は、定量位相画像の細胞輝度値と培養細胞の細胞径とに基づき、定量位相画像に含まれる培養細胞と培地との屈折率差情報を導出する。

このように構成することによって、画像解析部532は、定量位相画像の細胞輝度値と培養細胞の細胞径とに基づいて、定量位相画像に含まれる培養

細胞と培地との屈折率差情報を導出できる。インラインで、且つ非侵襲的な生存率および生細胞密度の評価ができる。

解析システム 1 において、画像解析部 532 は、屈折率差情報を式 (1) に基づいて導出する

$$\text{位相量} = (2 \times \pi \times \Delta n \times \text{細胞厚}) / \lambda \quad (1)$$

式 (1) において、 λ は観測波長、 Δn は細胞と培地の屈折率差であり、位相量は定量位相画像の細胞輝度値に相当し、細胞厚は前記細胞径に相当し、細胞輝度値を細胞径で除算することで屈折率差情報を得る。

このように構成することによって、画像解析部 532 は、位相量を導出できるため、導出した位相量に基づいて、屈折率差情報を導出できる。インラインで、且つ非侵襲的な生存率および生細胞密度の評価ができる。解析システム 1 において、画像解析部 532 は、屈折率差情報に基づいて培養細胞の中で生細胞と死細胞とを判定し、生細胞の計数結果と観測された細胞数とに基づいて、式 (2) によって、培養細胞の生存率を導出する、

$$\text{生存率} [\%] = 100 \times (\text{生細胞数}) / (\text{観測された細胞数}) \quad (2)$$

このように構成することによって、画像解析部 532 は、生細胞の計数結果と観測された細胞数とに基づいて、生存率を導出できる。インラインで、且つ非侵襲的な生存率および生細胞密度の評価ができる。

解析システム 1 において、画像解析部 532 は、屈折率差情報に基づいて培養細胞の中で生細胞と死細胞とを判定し、生細胞の計数結果と観測視野中の容器の容量とに基づいて、式 (3) によって、生細胞の生細胞密度を導出する。

$$\text{生細胞密度} [\text{cells} / \text{mL}] = (\text{生細胞数}) / (\text{観測視野容量}) \quad (3)$$

このように構成することによって、画像解析部 532 は、生細胞の計数結果と観測視野中のセルの容量とに基づいて、生細胞密度を導出できる。インラインで、且つ非侵襲的な生細胞密度の評価ができる。

[0073] (実施形態の変形例)

実施形態の変形例の解析システム 1 a は図 1 を適用できる。ただし、解析装置 4 0 の代わりに解析装置 4 0 a を備える。解析システム 1 a は、顕微鏡本体部 1 0 0 と、解析装置 4 0 a とを備える。

図 1 8 は、実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置の構成を示した図である。解析装置 4 0 a は、入力部 4 1 と、表示部 4 2 と、通信部 4 3 と、記憶部 4 4 と、制御部 5 0 a とを備える。制御部 5 0 a は、装置制御部 5 1 と、画像作成部 5 2 と、解析部 5 3 a とを備える。装置制御部 5 1 は、最適条件計算部 5 1 1 を備える。画像作成部 5 2 は、位相復元処理部 5 2 1 と、画像構築部 5 2 2 とを備える。解析部 5 3 a は、取得部 5 3 1 と、画像解析部 5 3 2 a とを備える。

[0074] 実施形態の変形例では、解析装置 4 0 a は、実際に抗体生産細胞を用いて、屈折率差 (Δn) を評価し、細胞培養工程中の比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) のヒストグラムの平均値との間の相関に基づいて、培養中の比抗体生産速度の予測と、培養工程中の細胞の監視と、その制御等を行う。屈折率差 (Δn) のヒストグラムは、培養細胞が抗体を生産する指標の一例である。

実施形態の変形例では、培養細胞を抽出し、抽出した培養細胞について、生化学検査にて培養細胞が生産する抗体濃度を算出する。解析装置 4 0 a は、算出した抗体生産物の濃度と、生細胞の生細胞密度とに基づき、抗体産生細胞の比抗体生産速度を算出する。解析装置 4 0 a は、複数の培養細胞と培地との屈折率差に係る屈折率差情報に基づき、生細胞密度を算出する。

[0075] 抗体生産細胞の比抗体生産速度の見積もりについて説明する。顕微鏡本体部 1 0 0 および観測容器は実施形態を適用できる。実施形態で示した図 1 1 をよく見ると、屈折率差 (Δn) のヒストグラム分布において、生細胞の集団の中の屈折率差 (Δn) に分布が存在していることがわかる。タンパク質やその構成要素であるアミノ酸は培地の主成分である水と比較すると高いモル屈折率を有している。細胞内にタンパク質やその構成要素であるアミノ酸が多

いと屈折率差 (Δn) は大きくなり、その細胞は活性化していると考えることができ、抗体生産能力の指標の一つになり得ると推測される。

実施形態の変形例では、細胞にトランスフェクションを行い、抗体 (IgG) を生成するように改良されたCHO細胞を用いて評価を行なった。

図19は、培養装置の一例を示す図である。

フラスコで約 0.5×10^6 [cells/mL] まで培養した細胞を、培養槽(Bioreactor)に移して培養を行なっている。この培養装置は灌流培養装置と呼ばれ、培養によって生じた泡の脱泡機能、培養槽内を均一に攪拌する機能、培養槽内の温度を均一にする機能、溶存酸素やpHをモニタリングする機能に加えて、細胞の栄養素であるグルタミン(Glutamine)、グルコース(Glucose)を含む培地が適宜添加されるよう設計されている。そのため培養槽内の液量を常に一定にするために、細胞を除いた抗体を含む培地 (ハーベスト(Harvest)) を、制御部(Controller)による制御で回収している。

[0076] また培養槽内の生細胞数を一定にするために、適宜細胞の間引きも行なっている (セルブリード(Cell bleeds))。培養開始から終了までの期間の間、定時刻に生化学検査手法を用いて培養槽の抗体濃度とハーベスト内の抗体濃度とをそれぞれ測定した。抗体生産細胞が1日あたりどれくらいの抗体を生産するかを示す指標である比抗体生産速度 [pg/cell/day] は以下の式 (5) により求めた。

[数1]

$$\text{比抗体生産速度} \left[\frac{\text{pg}}{\text{cell} \cdot \text{day}} \right] = \frac{\text{培養日における抗体生成物濃度}}{\int_{t_1}^{t_2} X dt} \quad \dots (5)$$

式 (5) の分母である積分の近似値の算定には、式 (6) に示されるように台形則を用いた。

[数2]

$$\int_{t_1}^{t_2} X dt \sim \frac{(t_2 - t_1) \times (X_{t_1} + X_{t_2})}{2} \quad \dots (6)$$

式 (5) と式 (6) とにおいて、 t_i ($i = 1, 2$) は培養日であり、 X

t_i は培養日 t_i における生細胞密度である。定刻に培養槽およびハーベットの抗体濃度をそれぞれ測定し、灌流率（ハーベストに向かう工程で培養槽に戻る割合）の重みづけ和をとり、式（５）および式（６）から比抗体生産速度を決定した。なお生細胞密度に関しては、実施形態で示した手法で算出した。

[0077] 培養槽から抗体生成濃度を測定する際に細胞懸濁液の一部を、図 8 A を参照して説明した容器に $5.3 \mu\text{L}$ 分注入し、顕微鏡本体部 100 のステージ 8 に配置した。顕微鏡本体部 100 を用いて、 $20\times$ 対物レンズ（NA0.75）、ズーム倍率 1.5 $\times$ 、白色 LED 光源を透過照明として明視野観察を行った。培養槽（800 mL）中の生細胞密度は 5.0×10^6 [cells/mL] の条件下で培養を行なっている。培養槽中の全生細胞数を観測するにあたって、要求精度 3%、信頼率 99% で評価するためには 1844 個の生細胞を観測すればよい。

図 8 A のセルを用いた場合、 $20\times$ 対物レンズの観測視野 0.391 mm 中の細胞数は 268 個と計算されるため、1844 個の細胞を観察するには、7 箇所の異なる位置で撮影を行えば、培養槽 800 mL 中の生細胞密度 5.0×10^6 [cells/mL] の細胞を評価するのに十分な標本数が得られる。

そこで顕微鏡本体部 100 のステージ 8 を移動させ、重複しない 7 箇所の位置で焦点位置および焦点位置からその前後 $5 \mu\text{m}$ 外れた明視野画像を取得した。こうして得られた明視野画像に対して、図 14 を参照して説明した方法により定量位相画像を構築した。定量位相画像に対して、図 15 を参照して説明した方法により屈折率差 (Δn) を導出した。定量位相画像に対して、図 16 を参照して説明した方法により生細胞密度を導出した。以上の処理を指定培養期間繰り返した。

[0078] 図 20 は、比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) の平均値との関係の一例を示す図である。図 20 は、比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) の平均値などの屈折率差情報との関係を示す。図 20 に示すように、比抗体生産速度と屈

折率差 (Δn) の平均値との間に興味深い相関が見られた。図 20 によれば相関係数約 0.85 で比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) の平均値との間に相関が見られる。

以上から、培養条件決定時等に抗体生成物濃度を予め取得し、同時に定量位相画像の構築および屈折率差 (Δn) 分布を求めておくことによって、比抗体生産速度と屈折率差 (Δn) の平均値とで比抗体生産速度と前記屈折率差情報との間の相関を示す検量線を決定することができる。これは屈折率差 (Δn) の平均値を定量位相画像から求めることで培養槽中の比抗体生成速度を見積もることが可能であることを示している。

画像解析部 532a は、画像解析部 532 を適用できる。画像解析部 532a は、取得部 531 から定量位相画像を取得する。画像解析部 532a は、定量位相画像閾値を決定し、決定した定量位相画像閾値に基づいて、定量位相画像を 2 値化する。

画像解析部 532a は、定量位相画像を 2 値化した結果に基づいて、細胞体マスクを生成する。

画像解析部 532a は、隣接する細胞体マスクを分割する。画像解析部 532a は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外する。画像解析部 532a は、定量位相画像のエッジに存在する一又は複数の細胞の各々に該当する細胞体マスクを除外した残りの一又は複数の細胞体マスクの各々について、細胞体マスクの真円度を導出する。画像解析部 532a は、導出した一又は複数の細胞体マスクの各々の真円度に基づいて、真円度が予め決定される真円度閾値以上の細胞体マスクを抽出する。真円度閾値の一例は、0.8 である。

[0079] 画像解析部 532a は、抽出した一又は複数の細胞体マスクの各々の細胞径を算出する。例えば、画像解析部 532a は、細胞径を、細胞径 = $2 \times \sqrt{(\text{細胞体マスクの面積} / \pi)}$ によって算出する。

画像解析部 532a は、定量位相画像に含まれる細胞の画像に、細胞体マスクを当てる（重ねる）ことによって、細胞体マスク内の最大輝度値を算出

する。

画像解析部532aは、算出した細胞体マスク内の最大輝度値と細胞径とに基づいて、最大輝度値を細胞径で除算することによって、細胞内と培地との屈折率差 Δn を算出する。画像解析部532aは、算出した屈折率差 Δn を横軸とし、Countを縦軸とするヒストグラムを作成する。

画像解析部532aは、作成したヒストグラムに基づいて、生死判定閾値を導出する。画像解析部532aは、導出した生死判定閾値に基づいて、生細胞数を取得する。画像解析部532aは、取得した生細胞数に基づいて、比抗体生産速度を算出する。画像解析部532aは、細胞内と培地との屈折率差 Δn の算出結果に基づいて、屈折率差 Δn の平均値を算出する。画像解析部532aは、比抗体生産速度の算出結果と、屈折率差 Δn の平均値の算出結果とに基づいて、比抗体生産速度と、屈折率差 Δn の平均値との相関をプロットする。画像解析部532aは、比抗体生産速度と、屈折率差 Δn の平均値との相関をプロットした結果である比抗体生産速度検量線を、記憶部44に記憶させる。

画像解析部532aは、記憶部44に記憶されている比抗体生産速度検量線を読み込む。画像解析部532aは、培養細胞の定量位相画像を生成する。画像解析部532aは、生成した培養細胞の定量位相画像に基づいて、細胞と培地との屈折率差(Δn)の平均値を算出する。画像解析部532aは、比抗体生産速度検量線と屈折率差(Δn)の平均値の算出結果とに基づいて、比抗体生産量を算出する。

[0080] (解析システムの動作)

図21は、実施形態の変形例に係る解析システムの動作の一例を示すフローチャートである。図21を参照して比抗体生産速度検量線の作成方法について説明する。

(ステップS1-4)

培養期間が決定される。

(ステップS2-4)

培養細胞が抽出される。

(ステップS 3-4)

抽出した培養細胞中の抗体濃度が測定される。培養細胞が生産する抗体生産物の濃度が算出される。

(ステップS 4-4)

非侵襲的細胞の生死判定フローが実行される。非侵襲的細胞の生死判定フローについては、図16を参照して説明したのでここでの説明は省略する。

[0081] (ステップS 5-4)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、比抗体生産速度を算出する。画像解析部532aは、抗体生産物の濃度と、生細胞の生細胞密度とに基づき、抗体生産細胞の比抗体生産速度を算出する。

(ステップS 6-4)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、非侵襲的細胞の生死判定フローで作成した屈折率差(Δn)から、屈折率差(Δn)の平均値などの屈折率情報を算出する。

(ステップS 7-4)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、算出した比抗体生産速度と屈折率差(Δn)の平均値との相関をプロットする。画像解析部532aは、比抗体生産速度と屈折率差(Δn)の平均値との相関をプロットした結果を、記憶部44に記憶させる。

(ステップS 8-4)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、ステップS 1-4で設定された培養期間が終了したか否かを判定する。培養期間が終了していない場合には、ステップS 1-4に戻る。培養期間が終了した場合には終了する。

[0082] 図22は、実施形態の変形例に係る解析システムの動作の一例を示すフローチャートである。図22を参照して比抗体生産量を求める方法について説明する。ここでは、比抗体生産速度検量線が記憶部44に記憶されている場

合について説明する。

(ステップS 1－5)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、記憶部44に記憶された比抗体生成速度検量線を読み込む。

(ステップS 2－5)

培養細胞が抽出される。

(ステップS 3－5)

定量位相画像生成フローが実行される。定量位相画像生成フローについては、図14を参照して説明したのでここでの説明は省略する。

(ステップS 4－5)

細胞と培地との屈折率差算出フローが実行される。細胞と培地との屈折率差算出フローについては、図15を参照して説明したのでここでの説明は省略する。

[0083] (ステップS 5－5)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、細胞内と培地との屈折率差(Δn)の算出結果に基づいて、屈折率差(Δn)の平均値を算出する。

(ステップS 6－5)

解析装置40aにおいて、画像解析部532aは、画像解析部532aは、比抗体生産速度検量線と屈折率差(Δn)の平均値の算出結果とに基づいて、比抗体生産量を算出する。

実施形態の変形例において、画像解析部532aは、屈折率差 Δn を横軸とし、Countを縦軸とするヒストグラムから屈折率差 Δn の中央値を取得し、取得した中央値と、中央値の算出結果と抗体生産速度との相関をプロットした結果とに基づいて、抗体生産速度を導出してもよい。

[0084] 実施形態の変形例において、画像解析部532aによる解析結果に基づいて、細胞の培養条件を設定するようにしてもよい。

抗体生産細胞を用いた抗体医薬品製造工程は図19に示す培養装置を用い

て、長期にわたって培養を行い、培養中に生成される抗体の抽出を行なっている。培養期間が進行し、培養末期になると、培養槽中の抗体の活性化能力は失われつつある。その結果、比抗体生産速度の低下や生存率の低下が生じるが比抗体生産速度の低下は生存率よりもより顕著に現れる。そこで、画像解析部532aは、比抗体生産速度をモニタしておき、その挙動に基づいて、培養期間の終了や培養条件を導出し、培養装置の制御部に対して、培養期間の終了や培養条件の変更を行うようにしてもよい。

図23は、実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置が表示する表示画面の例1を示す概念図である。図23に示すように、表示部42は、細胞画像と、検量線と、結果出力パラメータ（解析結果）とを表示する。

図24は、実施形態の変形例に係る解析システムに含まれる解析装置が表示する表示画面の例2を示す概念図である。図24に示すように、表示部42は、比抗体生産速度の経時変化を表示する。画像解析部532aは、比抗体生産速度の経時変化に基づいて、比抗体生産速度が比抗体生産速度閾値（破線で示す）以下となった場合に、警告を発するようにしてもよい。

[0085] 前述した実施形態、実施形態の変形例ではすでに樹立した細胞株を用いた例を示した。抗体医薬品の製造工程にはその上流工程として抗体生産細胞株の構築プロセスが存在し、抗体生産能力を決定する上で最も重要なプロセスとなる。ここでは宿主細胞への遺伝子組換えを行い、数えきれない多様性の中から増殖性に優れかつ抗体生産能力に優れた細胞株を探し出さなければならない。既に示したように定量位相画像中の細胞の輝度値は細胞厚と細胞内と培地の屈折率差の情報を表している。この輝度値を細胞厚で除算して得られる培地と細胞内との屈折率差（ Δn ）は細胞の活性化状態を示唆していると考えてよい。

そこで定量位相画像中の細胞の中から屈折率差（ Δn ）の大きな細胞を抽出し、抽出した細胞を単離して、増殖性能を確認するようにしてもよい。このように構成することによって、抗体生産能力が高くかつ増殖性能に優れた

細胞株を選択することが可能となる。前述した一細胞での評価は優秀な細胞株を探索するにとどまらず、例えば細菌等を液滴内に封入した系で細菌の耐薬品性を評価する、液滴内の培養条件を各種振ってあげることでの培養条件がその細菌に優れているのかを定量位相画像から判断することが可能となる。

[0086] 実施形態の変形例によれば、解析システム 1 a は、解析システム 1 において、画像解析部 5 3 2 a は、培養細胞が生産する抗体生産物の濃度を入力値とし、抗体生産物の濃度と、生細胞の生細胞密度とに基づき、培養細胞が抗体を生産する指標としての抗体生産細胞の比抗体生産速度を算出する。

このように構成することによって、解析システム 1 a は、培養細胞が生産する抗体生産物の濃度と、生細胞の生細胞密度とに基づき、抗体生産細胞の比抗体生産速度を算出できる。生死細胞判定を行う際に、生化学検査により培養槽中の抗体濃度測定することなく、抗体生産速度を見積もることができる。

解析システム 1 において、画像解析部 5 3 2 a は、屈折率差情報と比抗体生産速度との間の相関に基づき、抗体生産細胞の抗体生産量を算出する。

このように構成することによって、画像解析部 5 3 2 a は、複数の培養細胞と培地との屈折率差に係る屈折率差情報のヒストグラムに基づき、生細胞密度を算出できる。

このように構成することによって、比抗体生産速度と屈折率差情報との間の相関に基づき、抗体生産量を算出できる。

培養槽中の細胞状態を観察することによって、例えば屈折率差 Δn の分布が変化したことを検知して、培養期間の終了の判定や、グルコース濃度などの培養条件の導出ができる。このため、培養装置の制御部に対して、培養期間の終了や培養条件の変更を行うことができる。

[0087] 解析システム 1 において、画像解析部 5 3 2 a は、屈折率差を横軸とし、カウントを縦軸とするヒストグラムを作成し、生細胞と死細胞との判定を行う。

このように構成することによって、画像解析部 5 3 2 a は、複数の培養細胞と培地との屈折率差に係る屈折率差情報のヒストグラムに基づき、生細胞と死細胞とを判定できる。

解析システム 1 において、画像解析部 5 3 2 a は、比抗体生産速度と屈折率差情報との間の相関を示す検量線を決定し、決定された前記検量線に基づき、抗体生産量を算出する。

このように構成することによって、比抗体生産速度と屈折率差情報との間の相関を示す検量線を決定できるため、決定された検量線に基づき、抗体生産量を算出できる。

[0088] (各種観察容器の説明)

図 8 A と図 8 B で説明した細胞観察に使用される薄層の観察容器について、さらに改良された例を説明する。

観察容器（薄層セルと称す）は、細胞懸濁液（培地と複数の細胞）を収容する収容部（容器の内部空間部）を有し、複数の細胞の定量位相画像を取得して観察するのに適した観察容器である。収容部は、対物レンズ 2 1 a（観察光学系）の光軸方向において収容部の厚さが、培地で浮遊する細胞を所定観察時間の間、対物レンズ 2 1 a の合焦範囲（焦点深度範囲）に滞在させる条件を満たすように形成される。所定観察時間とは、複数の細胞の定量位相画像を取得するのに必要な撮像時間のことである。

従来、血球計算板やセルカウンターは低倍の観察系で細胞観察を行うため、細胞懸濁液を入れる容器の厚みの仕様を厳密に決める必要性がなかった。前述した実施形態などにおいて、浮遊細胞の細胞形態情報を高精度に観察する要求が生じている。

浮遊細胞の形態情報を高精度に計測するためには、細胞懸濁液を封入する観察容器の収容部は対物レンズ 2 1 a（観察光学系）の光軸方向の厚みを厳密に管理しなければならない。なぜなら収容部の厚さが浮遊する細胞の細胞径（サイズ）に対して十分に厚い場合（つまり細胞懸濁液層が厚い場合）、対物レンズ 2 1 a の光軸方向に（収容部の厚さ方向に）直交する方向に細胞

同士の位置関係が揃わず、観察視野内で焦点位置の異なる位置に細胞が滞在してしまう。そうすると、細胞観察時に個々の細胞でそれぞれオートフォーカス（Autofocus: AF）を駆動させる必要があり、スループットは大きく低下する。

一方、収容部の厚さを薄くすると、対物レンズ21aの光軸方向に直交する方向に（局所的な領域に）細胞の位置が限定されるために、観察視野内で焦点位置のほぼ同じ位置に細胞同士の位置関係は自ずと揃ってくる。観察容器は、浮遊細胞の形態情報を詳細に画像解析する場合の薄層容器である。

また、収容部の厚さの条件によらず、収容部内の複数の細胞の位置を、観察視野内で焦点位置のほぼ同じ位置に揃える方法としては、次の方法がある。注入する細胞懸濁液を、流路を形成する収容部内を所定の速度で流すことで、収容部を形成する内壁の摩擦（表面張力）により収容部の中央部分に細胞が集まり、収容部の厚さ方向の中心位置に細胞を揃えることができる。いわゆる層流条件を満たすことで流路中心部分の流速を最大にし、流路内の細胞の位置を揃える手法である。

[0089] 図25は、明視野画像の一例を示す図である。図25において、左図は直径（ Φ ）が $15\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを水溶液中に分散させ、厚さが $30\mu\text{m}$ （細胞径の2倍）の薄層セルで明視野観察した画像の写真である。顕微鏡での観察条件は、対物レンズ倍率 $40\times$ （開口数NA0.95）、ズーム比 $1.5\times$ である。左図によれば、視野内のビーズが全て焦点深度内にあることが分かる。

一方、右図は模式図であるが、直径（ ϕ ） $10\mu\text{m}$ の細胞を含む細胞懸濁液を厚さ $30\mu\text{m}$ （細胞径の3倍）の薄層セルに分注し、観察した場合を示す図である。右図によれば、焦点深度内の細胞と焦点深度外の細胞とがそれぞれ半々の確率で観察された。このことから薄層セル内の収容部の厚さは細胞径の3倍以下、好ましくは2倍以下となるように調整する必要があることが分かる。

収容部の厚さを、上記のように構成することによって、培地で浮遊する細

胞を所定観察時間の間、対物レンズ21aの合焦範囲内（焦点深度範囲内）に滞在させる条件を満たすことができる。

例えば、対物レンズ21aの光軸方向において収容部の厚さが細胞径の3倍以上であっても、上述したように収容部を流路で形成することで目的を達成できる。後述（図29A以降の例）するように収容部を流路で形成すれば、培地で浮遊する細胞を収容部の厚さ方向に直交する方向に並べることができ、かつ、所定観察時間の間、対物レンズ21aの焦点位置を含む光軸方向の焦点深度内に滞在させることができる。

このように収容部を構成することによって、基板に対して対物レンズ21aの焦点位置を所定量のオフセットを調節することで安定的に細胞を観察できる。例えば、焦点位置の制御方法は、特開2007-148159号公報のオフセットレンズを用いた自動焦点制御方法を用いることができる。この方法によれば、対物レンズの焦点位置を一旦、カバーガラスあるいはスライドガラスの表面に焦点を合わせた後に、オフセットレンズを用いて収容部内の所定位置に焦点位置を移動させることができる。これにより、対物レンズの焦点位置を収容部内の所定位置に常時、維持できる。

収容部は、光軸方向とは直交する方向から見た場合に、狭くなるように湾曲した内面を有するようにしてもよい。ここでの湾曲とは、流路の形状に特徴を持たせることで流路内の流速を変化させ、収容部の細胞を合焦範囲内に揃えることを指している。このように構成することによって合焦範囲に滞在する細胞数を増やすことなどの利点がある。

[0090] また薄層セルに分注する細胞濃度は、式（7）以下であることが好ましい。

$$\text{細胞濃度} [\text{個}/\mu\text{L}] = 0.5 \times (W/D) \times (H/D) / (T \times W \times H) \quad (7)$$

式（7）において、薄層セルの収容部が細胞懸濁液の滴下領域 $W \times H$ 、厚さ T [mm] である。 W が横幅 [mm] であり、 H が縦幅 [mm] であり、そして、 T は厚さである。また、 D は細胞径 [mm] である。細胞濃度は5

0%以下が好ましい。50%以下のため、数式の右辺に0.5が掛けられている。細胞濃度が高すぎると、観察光学系の光軸方向において細胞の位置がずれてくるためである。

例えば、薄層セルの収容部は滴下領域 $W \times H$ が $10 \times 10 \text{ mm}$ 、厚さ T が 0.01 mm であり、かつ細胞径 D が $10 \mu\text{m}$ の場合は、細胞濃度の上限値が 0.5×10^6 [個/ μL]となる。

図26は、対物レンズ NA と焦点深度との関係の一例を示す図である。

観測波長(λ)が 550 [nm] 、媒体屈折率(n)が 1.33 の場合について示す。

焦点深度は、式(8)によって算出した。

$$\text{焦点深度} = 0.5 \times \lambda \times n / (n - \sqrt{n^2 - NA^2}) \quad (8)$$

収容部の厚さ T は、観察対象の細胞径 D と観察光学系の合焦範囲とに基づいて定められる。

[0091] 図27は、観察容器の一例を示す図である。細胞径が異なる場合、細胞径に合わせた薄層容器が必要となる。また細胞が弾性体であるため、少しくらい押し付けても問題ないと想定される。押し付けることによって、細胞が潰れてしまうおそれがあるが観察することができるためである。観察容器は、細胞懸濁液の厚みを動的に制御する。

観察容器は、基板 S (裏面板層)と弾性体 EB と遮蔽板 SV とカバーガラス CG (表面板層)と隔壁 SW とを備える。入射方向から逆に基板 S と弾性体 EB と遮蔽板 SV とカバーガラス CG とが順に積層されている。基板 S と弾性体 EB と遮蔽板 SV とカバーガラス CG とが順に積層されている端部には隔壁 SW が配置されている。入射方向において、遮蔽板 SV とカバーガラス CG との間に収容部が形成される。

基板 S には、細胞懸濁液用ポートと流体加圧用ポートとが形成されている。細胞懸濁液用ポートから細胞懸濁液を容器内に分注する。流体加圧用ポートから流体を分注することで弾性体 EB が拡張し、細胞懸濁液の厚みを変更

する。弾性体E Bは、シリコン、ウレタンなどの膨張しやすい材料で構成される。流体加圧用ポートからの加圧量により細胞懸濁液の厚みを制御する。例えば、流体加圧用ポートからの加圧量により細胞懸濁液の厚みが、 $5\text{ }\mu\text{m}$ から $10\text{ }\mu\text{m}$ に制御される。

[0092] 図28は、観察容器の一例を示す図である。図28は、図27において、左図は透過照明用の観察容器とし、右図は反射照明用の観察容器としたものである。

透過照明用の観察容器において、基板Sは透明基板TSであり、透明基板TSの入射側に透明照明TLが配置される。反射照明用の観察容器において、基板Sは不透明基板OSである。

[0093] 観察容器の他の例である収容部の内部形状について説明する。

観察容器の他の内部形状の例は、マイクロ流路タイプにし、表面張力で薄層セル内に細胞懸濁液を誘導する。流量分布は流路中心が速いため、中心部に局在化しやすいと想定される。

図29Aは、観察容器の他の例1を示す図である。図29Aにおいて、上図はZ軸のマイナス側から観察容器を見た図であり、下図はZ軸に垂直な方向から観察容器を見た図である。

観察容器は、カバー部CUと基部Bとを備える。カバー部CUと基部Bとの一例は樹脂によって作成される。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合に、基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とZ軸方向に沿った高さ（厚さ）方向とを有する。

カバー部CUにおいて、凹部の長手方向の一端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。細胞を観察する位置である観察スポットが流路に一又は複数形成される。図29Aでは、5か所の観察スポットの

イメージが示されている。流路について、Y軸方向の長さの一例は15mm程度であり、X軸方向の長さの一例は100mm程度であり、高さ方向の長さの一例は、細胞の大きさ（直径）の2倍から3倍である。

カバー部CUにおいて、少なくともZ軸のプラス方向が凹部に該当する部分は透明である。このように構成することによって、Z軸のマイナス方向から細胞を観察することができる。流路を形成することによって図8Aを参照して説明した容器と比較して、煩わしい操作を不要にできる。具体的には、剥離シートの除去作業を不要にでき、精密な細胞懸濁液の定量分注を不要にでき、カバーガラスの密封を不要にできる。カバーガラスの密封を不要にすることによって、気泡混入のリスクを低減できる。

[0094] 図29Bは、観察容器の他の例2を示す図である。図29Bにおいて、上図はZ軸のマイナス側から観察容器を見た図であり、下図はZ軸に垂直な方向から観察容器を見た図である。観察容器は、カバー部CUと基部Bとを備える。カバー部CUと基部Bとの一例は樹脂によって作成される。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合に、基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向とY軸方向とにおいて、X軸に沿った方向とY軸に沿った方向との間で蛇行し、Z軸方向に沿った高さ（深さ）方向とを有する。

カバー部CUにおいて、流路の一端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。細胞を観察する位置である観察スポットが流路に一又は複数形成される。図29Bでは、14か所の観察スポットのイメージが示されている。

流路において、X軸方向又はY軸方向の長さ一例は15mm程度であり、高さ方向の長さの一例は、細胞の大きさ（直径）の2倍から3倍である。カバー部CUにおいて、少なくともZ軸のプラス方向が凹部に該当する部分は

透明である。このように構成することによって、図29Aの効果に加えて、蛇行流路にできるため、観察容器に複数の観察スポットを配置できるとともに観察容器の省スペース化できる。具体的には、図29Bにおいて、図29Aと同じ観察スポットの数とした場合は、流路を蛇行させることで、カバー部CUと基部BのX方向の寸法を短くすることができるため、X方向の省スペース化ができる。この場合、X方向において、デバイスの小型化を図れるとともに、X方向の流路の長さを短くできるため液量を削減できる可能性がある。

ただし、流路を蛇行させている分、Y方向の寸法は大きくなる可能性がある。別の効果として、カバー部CUと基部BのX方向の寸法が図29Aのものと同じ場合には、観察スポットの数を増やすことができる。

[0095] 図29Cは、観察容器の他の例3を示す図である。図29Cにおいて、上図はZ軸のマイナス側から観察容器を見た図であり、下図はZ軸に垂直な方向から観察容器を見た図である。観察容器は、カバー部CUと基部Bとを備える。カバー部CUと基部Bとの一例は樹脂によって作成される。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合に、基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とZ軸方向に沿った高さ（深さ）方向とを有する。ただし、流路において、Y軸方向の一部が拡張されている。

カバー部CUにおいて、凹部の長手方向の一端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。細胞を観察する位置である観察スポットが流路に一又は複数形成される。図29Cでは、9か所の観察スポットのイメージが示されている。

Y軸方向の長さの一例は流路が拡張されていない部分では15mm程度であり、流路が拡張されている部分では45mm程度である。流路において、

X軸方向の長さの一例は100mm程度であり、高さ方向の長さの一例は、細胞の大きさ（直径）の2倍から3倍である。カバー部CUにおいて、少なくともZ軸のプラス方向が凹部に該当する部分は透明である。このように構成することによって、Z軸のマイナス方向から細胞を観察することができる。このように構成することによって、図29Aの効果に加えて、拡張流路形状にすることができるため、観察容器を省スペース化できる。具体的には、図29Cにおいて、図29Aと同じ観察スポットの数とした場合は、拡張流路形状とすることで、カバー部CUと基部BのX方向の寸法を短くすることができるため、X方向の省スペース化ができる。この場合、X方向において、デバイスの小型化を図れるとともに、X方向の流路の長さを短くできるため液量を削減できる可能性がある。

ただし、拡張流路形状としている分、Y方向の寸法は大きくなる可能性がある。別の効果として、カバー部CUと基部BのX方向の寸法が図29Aのものと同じ場合には、観察スポットの数を増やすことができる。

[0096] 図30Aは、観察容器の他の例4を示す図である。観察容器の他の例4は、図29Cにおいて、流路を流れる細胞懸濁液を層流としたものである。注入口から流路に細胞懸濁液が導入された時の流速分布により、流路中央に細胞が集まると想定される。このように構成することによって、細胞を再現よく局在させることができる。

図30Bは、観察容器の他の例5を示す図である。図30Bは、図29Cで説明した観察容器の他の例を示す。図30Bにおいて、上図は流路において、Z軸方向に沿って柱（ピラー）を一又は複数配置したものである。ピラーの一例は樹脂によって作成される。ピラーはカバー部CUに配置してもよいし、基部Bに配置してもよい。この例では、9本の柱が配置されている。下図は流路において、X軸方向に沿って溝を一又は複数配置したものである。溝の一例は樹脂によって作成される。この例では、4本の溝が配置されている。溝はカバー部CUに配置してもよいし、基部Bに配置してもよい。このように構成することによって、必要に応じて、材質、表面処理を行うこと

によって、表面の親水性、撥水性をコントロールできる。

[0097] 図30Cは、観察容器の他の例6を示す図である。図30Cにおいて、上図はZ軸のマイナス側から観察容器を見た図であり、下図はZ軸に垂直な方向から観察容器を見た図である。観察容器は、カバー部CUと基部Bとを備える。カバー部CUと基部Bとの一例は樹脂によって作成される。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合に、基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とZ軸方向に沿った高さ（厚さ）方向とを有する。ただし、流路において、Y軸方向の一部が拡張されている。カバー部において、凹部の長手方向の一端の部分のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。さらに、基部Bにおいて、注入口のZ軸のプラス側に空間を設ける。このように構成することによって、注入口から細胞懸濁液を流路に誘導した場合に、細胞が分散した状態を維持しやすいと想定される。

[0098] 図30Dは、観察容器の他の例7を示す図である。図30Dにおいて、上図はZ軸のマイナス側から観察容器を見た図であり、下図はZ軸に垂直な方向から観察容器を見た図である。観察容器は、カバー部CUと基部Bとを備える。カバー部CUと基部Bとの一例は樹脂によって作成される。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合に、基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とZ軸方向に沿った高さ（深さ）方向とを有する。

カバー部CUにおいて、凹部の長手方向の一端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。流路に細胞を観察する位置である観察

スポットが一又は複数形成される。図30Dでは、1か所の観察スポットのイメージが示されている。カバー部CUにおいて、観察スポットの部分以外が流路の高さが高くなるように、Z軸方向の厚さが薄く加工されている。流路において、Y軸方向の長さの一例は15mm程度であり、X軸方向の長さの一例は100mm程度であり、高さ方向の長さの一例は、細胞の大きさ（直径）の2倍から3倍である。カバー部CUにおいて、少なくともZ軸のプラス方向が凹部に該当する部分は透明である。このように構成することによって、観察エリア以外の流路の高さを高くできるため、圧力損失を低減でき、細胞懸濁液を流れやすくできる。

[0099] 図31は、観察容器の他の例8を示す図である。図31は、Z軸のマイナス側から観察容器を見た図である。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合は前述（図29A）と同様であるため、省略されている。観察容器の他の例7は、注入口と出口とを合流できる位置に配置したものである。このように構成することによって、注入口から細胞懸濁液を注入した場合に、界面の位置を揃えることができるため、細胞懸濁液の流れを止めることができる。

図32は、観察容器の他の例9を示す図である。図32は、Z軸のマイナス側から観察容器を見た図である。Z軸に垂直な方向から観察容器を見た場合は前述（図29C）と同様であるため、省略されている。Z軸のマイナス側から観察容器を見た場合に、カバー部CUの形状は、矩形であり、X軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とを有する。基部Bは、細胞懸濁液の流路となる凹部を有する。凹部の一例はX軸方向に沿った長手方向とY軸方向に沿った短辺方向とZ軸方向に沿った高さ（深さ）方向とを有する。ただし、流路において、Y軸方向の一部が拡張されている。

カバー部CUにおいて、凹部の長手方向の一端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口を有し、他端のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を排出するための排出口を有する。排出口のY軸方向の長さは、注入口のY軸方向の長さよりも短い。このように構成することによって、細胞の濃度分布、局在状態を作り出せるため、仮にサンプル液ごとに細胞濃度にむらがある

ある場合でも、所望の濃度の部分を観察できる。

[0100] カバー部において、凹部の任意の2つの部分のZ軸のマイナス側に細胞懸濁液を注入するための注入口と細胞懸濁液を排出するための排出口を有するようにしてもよい。

前述した観察容器によれば、観察容器は、培地と複数の細胞を収容する収容部を有し、複数の細胞の定量位相画像を取得して観察するための観察容器である。収容部は、観察光学系の光軸方向において収容部の厚さが、培地で浮遊する細胞を所定観察時間の間、観察光学系の焦点深度内に滞在させる条件を満たすように形成される。

観察容器において、収容部の内面形状は、観察対象の複数の細胞を観察光学系の光軸と直交する方向であって、合焦範囲内に揃えるような形状に構成される。

このように構成された収容部は、観察光学系の合焦範囲（焦点深度内）に滞在する細胞数を増加させることができる。

[0101] 観察容器において、観察光学系の光軸方向の収容部の厚さは、観察対象の細胞の径に基づいて定められる。このように構成することによって、観察光学系の光軸方向の収容部の厚さを、観察対象の細胞の径に基づいて定めることができるため、観察光学系の合焦範囲に滞在する細胞数を増加させることができる。

観察容器において、収容部の厚さは、観察対象の細胞の径と観察光学系の合焦範囲とに基づいて定められる。このように構成することによって、収容部の厚さを、観察対象の細胞の径と観察光学系の合焦範囲とに基づいて定めることができるため、観察光学系の合焦範囲に滞在する細胞数を増加させることができる。

観察容器において、収容部の内面形状は、光軸方向とは直交する方向に延びた内部空間（円柱、角柱、流路など様々な形状の空間）を形成し、収容部の厚さ（高さ）方向において狭くなるように湾曲した内面、あるいは段階的に狭くなる内面を有する。このように収容部を構成することによって、収容

部の狭く形成された部分（領域）において観察することで、観察光学系の合焦範囲に滞在する細胞数をさらに増加させ、かつ多くの細胞の定量位相画像を取得することができる。

観察容器において、観察容器は、３層構造で構成され、３層構造は、表面板層と収容部が形成される中間板層と裏面板層とを含み、裏面板層は、培地の液体を注入する注入口と、培地の液体を排出する排出口とが形成されている。

このように構成することによって、流路を形成することができるため、剥離シートの除去作業、精密な細胞懸濁液の定量分注、カバーガラスの密封などの煩わしい操作を不要にできる。

観察容器において、観察容器の素材は樹脂である。このように構成することによって、観察容器の作成を容易にできる。

以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、この発明の要旨を逸脱しない範囲の設計等も含まれる。

符号の説明

[0102] １、１ a…解析システム、７…結像光学系、８…ステージ、９…検出部、１０…透過照明光学系、２０…対物光学系、２１、２１ a、２１ b、２１ c…対物レンズ、３０…リレー光学系、４０、４０ a…解析装置、５０…制御部、５１…装置制御部、５２…画像作成部、１００…顕微鏡本体部、５１１…最適条件計算部、５２１…位相復元処理部、５２２…画像構築部、５３…解析部、５３１…取得部、５３２、５３２ a…画像解析部、 i 、 i １、 i ２、 i ３…計測面、 F …焦点位置、 PSF …点像強度分布、 S …対象物、 Δx 、 Δy …サンプリング間隔、 Δz …焦点間隔

請求の範囲

[請求項1] 培地で培養された複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得する取得部と、

前記細胞画像に含まれるそれぞれの前記培養細胞の輝度値と細胞径とに基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の前記培養細胞について生存状態を解析する画像解析部と

を備える、解析システム。

[請求項2] 前記画像解析部は、前記培養細胞の輝度値と細胞径とに基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の前記培養細胞と培地との屈折率差を導出し、前記屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の前記培養細胞について、前記培養細胞の生存率と前記培養細胞中の生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出する、

請求項1に記載の解析システム。

[請求項3] 前記取得部は前記細胞画像の光強度分布データに基づき定量位相画像を取得し、

前記画像解析部は、前記定量位相画像の細胞輝度値と前記培養細胞の細胞径とに基づき、前記定量位相画像に含まれる前記培養細胞と培地との前記屈折率差情報を導出する、

請求項2に記載の解析システム。

[請求項4] 前記画像解析部は、前記屈折率差情報を式(1)に基づいて導出する

$$\text{位相量} = (2 \times \pi \times \Delta n \times \text{細胞厚}) / \lambda \quad (1)$$

式(1)において、 λ は観測波長、 Δn は細胞と培地の屈折率差であり、位相量は前記定量位相画像の前記細胞輝度値に相当し、細胞厚は前記細胞径に相当し、

前記細胞輝度値を前記細胞径で除算することで前記屈折率差情報を得る、

請求項3に記載の解析システム。

[請求項5] 前記画像解析部は、前記屈折率差情報に基づいて前記培養細胞の中で生細胞と死細胞とを判定し、前記生細胞の計数結果と観測された細胞数とに基づいて、式(2)によって、培養細胞の前記生存率を導出する、

$$\text{生存率} [\%] = 100 \times (\text{生細胞数}) / (\text{観測された細胞数})$$

(2)

請求項2又は請求項3に記載の解析システム。

[請求項6] 前記画像解析部は、前記屈折率差情報に基づいて前記培養細胞の中で生細胞と死細胞とを判定し、前記生細胞の計数結果と観測視野中の容器の容量とに基づいて、式(3)によって、前記生細胞の生細胞密度を導出する、

$$\text{生細胞密度} [\text{cells} / \text{mL}] = (\text{生細胞数}) / (\text{観測視野容量})$$

(3)

請求項2又は請求項3に記載の解析システム。

[請求項7] 前記画像解析部は、前記培養細胞が生産する抗体生産物の濃度を入力値とし、前記抗体生産物の濃度と、前記生細胞の生細胞密度とに基づき、培養細胞が抗体を生産する指標としての抗体生産細胞の比抗体生産速度を算出する、請求項6に記載の解析システム。

[請求項8] 前記画像解析部は、前記屈折率差情報と前記比抗体生産速度との間の相関に基づき、前記抗体生産細胞の抗体生産量を算出する、請求項7に記載の解析システム。

[請求項9] 前記画像解析部は、前記屈折率差を横軸とし、カウントを縦軸とするヒストグラムを作成し、前記生細胞と前記死細胞との判定を行う、請求項5又は請求項6に記載の解析システム。

[請求項10] 前記画像解析部は、前記比抗体生産速度と前記屈折率差情報との間の相関を示す検量線を決定し、決定された前記検量線に基づき、抗体生産量を算出する、請求項8に記載の解析システム。

- [請求項11] 培地と複数の細胞を収容する収容部を有し、前記複数の細胞の定量位相画像を取得して観察するための観察容器であって、
- 前記収容部は、観察光学系の光軸方向において前記収容部の内面形状が、前記培地で浮遊する前記細胞を所定観察時間の間、前記観察光学系の合焦範囲に滞在させる条件を満たすように形成される、観察容器。
- [請求項12] 前記収容部の内面形状は、観察対象の前記複数の細胞を前記観察光学系の光軸と直交する方向であって、前記合焦範囲内に揃えるような形状に構成された、請求項11に記載の観察容器。
- [請求項13] 前記観察光学系の光軸方向の前記収容部の厚さは、観察対象の前記細胞の径に基づいて定められる、
- 請求項12記載の観察容器。
- [請求項14] 前記収容部の内面形状は、前記光軸方向とは直交する方向に延びた内部空間を形成し、前記収容部の厚さ方向において狭くなるように湾曲した内面、あるいは段階的に狭くなる内面を有する、
- 請求項13記載の観察容器。
- [請求項15] 前記観察容器は、3層構造で構成され、
- 前記3層構造は、表面板層と前記収容部が形成される中間板層と裏面板層とを含み、
- 前記裏面板層は、前記培地の液体を注入する注入口と、前記培地の液体を排出する排出口とが形成されている、請求項12に記載の観察容器。
- [請求項16] 前記観察容器の素材は樹脂である、請求項11に記載の観察容器。
- [請求項17] コンピュータが実行する解析方法であって、
- 複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、
- 取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、
- 導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する屈折率差情報

に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞について、培養細胞の生存率と生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出するステップと

を有する、解析方法。

[請求項18]

コンピュータが実行する解析方法であって、

複数もしくは単数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、

取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、

導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞について、高い屈折率差を有する集団が培養細胞の中で抗体生産能力の優れた細胞であると判断するステップを有する、解析方法。

[請求項19]

コンピュータに、

複数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、

取得する前記ステップで取得した前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステップと、

導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する屈折率差情報に基づいて、前記細胞画像に含まれる複数の培養細胞について、培養細胞の生存率と生細胞の生細胞密度とのいずれか一方又は両方を導出するステップと

を実行させるプログラム。

[請求項20]

コンピュータに、

複数もしくは単数の培養細胞の画像を含む細胞画像を取得するステップと、

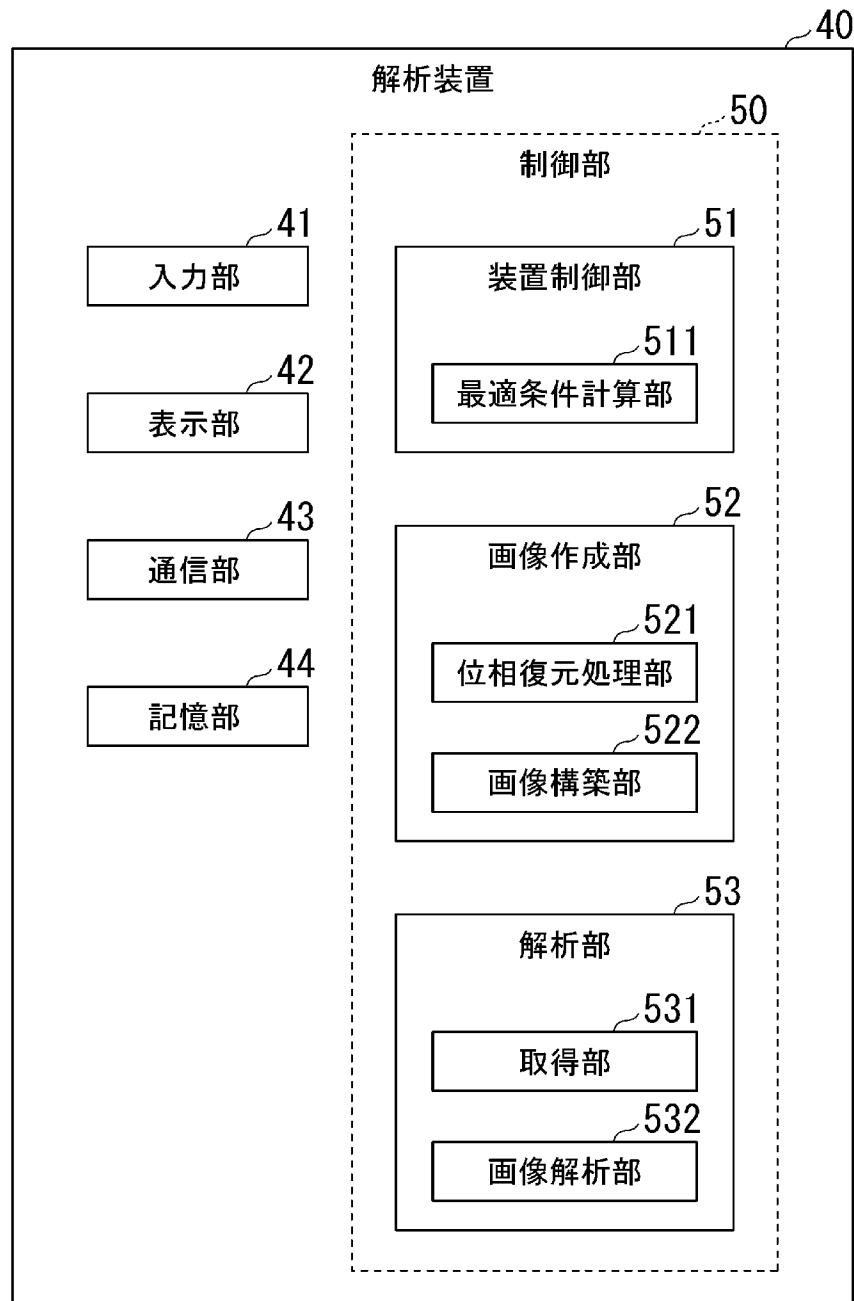
取得する前記ステップで取得した前期細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞の中の培地と細胞内との屈折率差を導出するステ

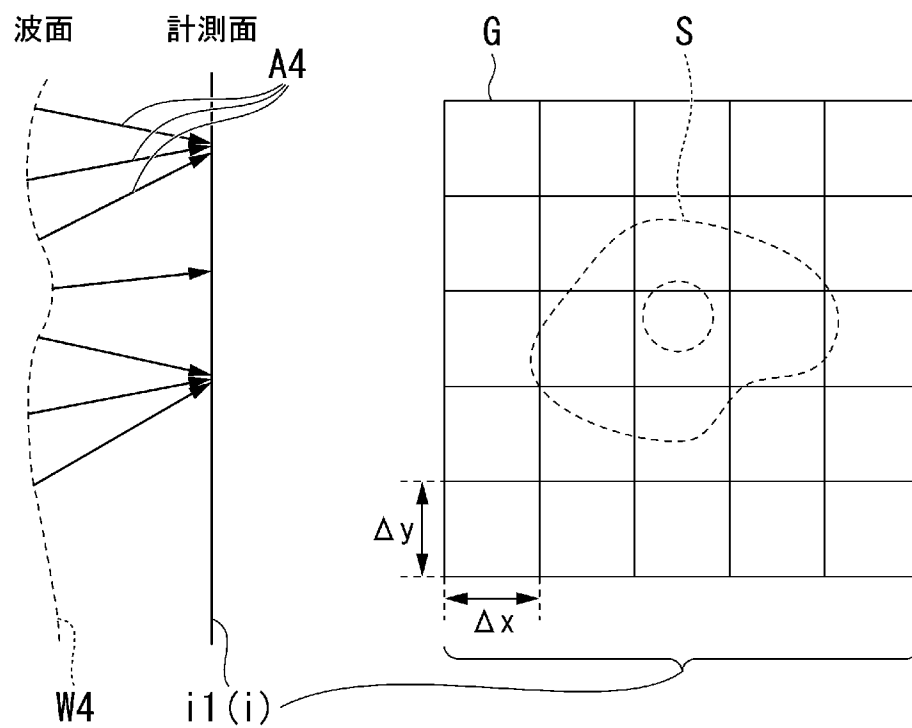
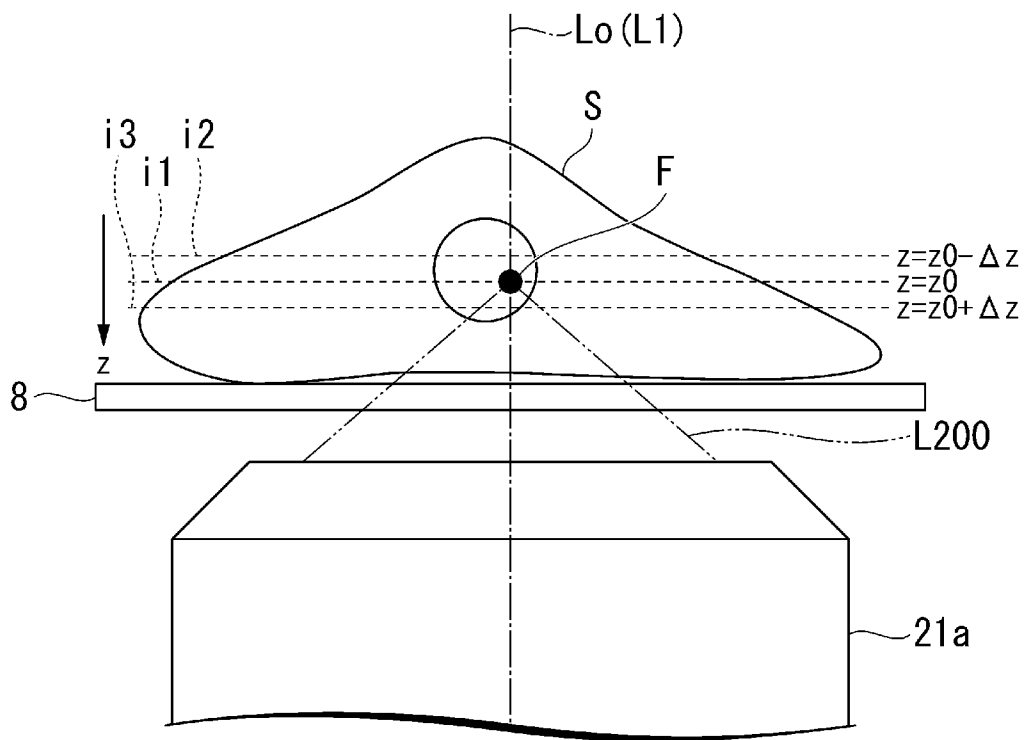
ップと、

導出する前記ステップで導出した屈折率差を特定する情報に基づいて、前期細胞画像に含まれる複数もしくは単数の培養細胞について、高い屈折率差を有する集団が培養細胞の中で抗体生産能力の優れた細胞であると判断するステップと

を実行させるプログラム。

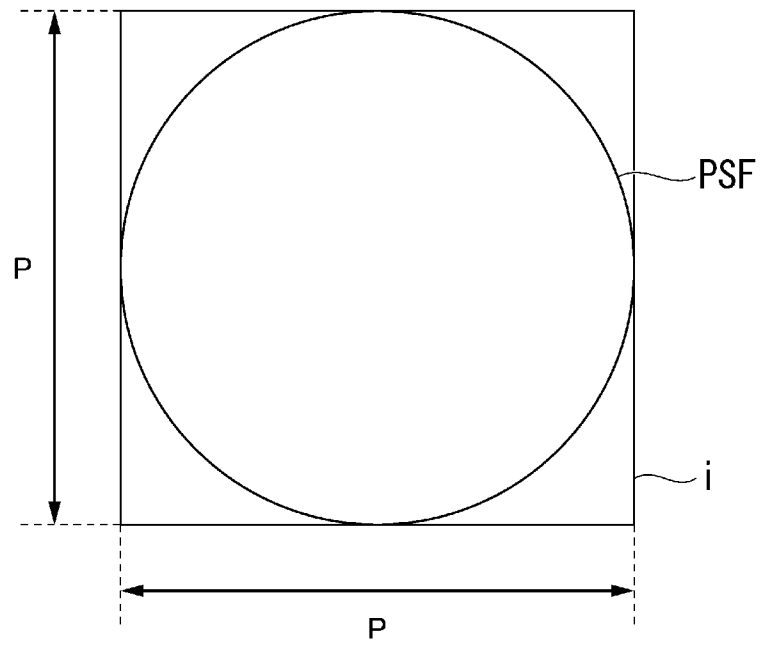
[図2]



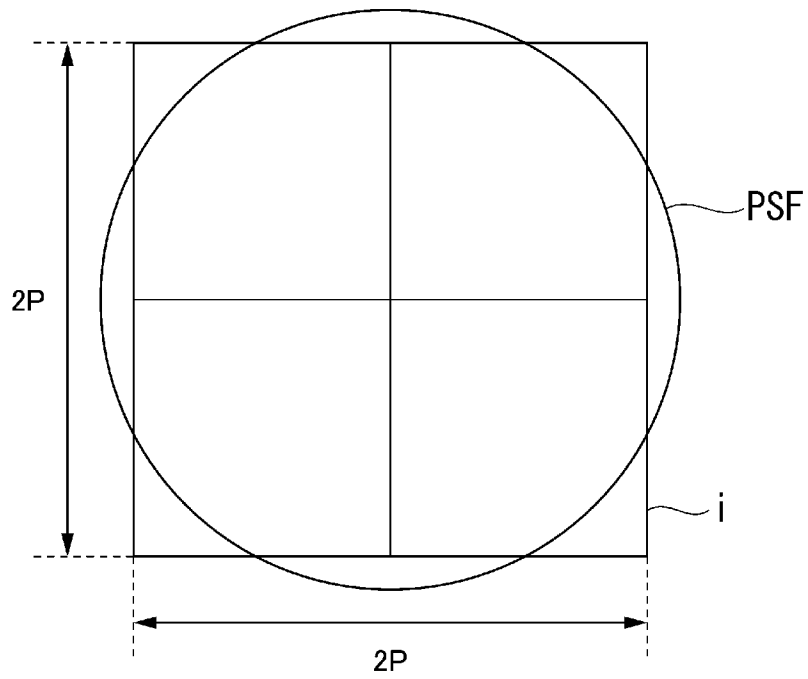


[図7]

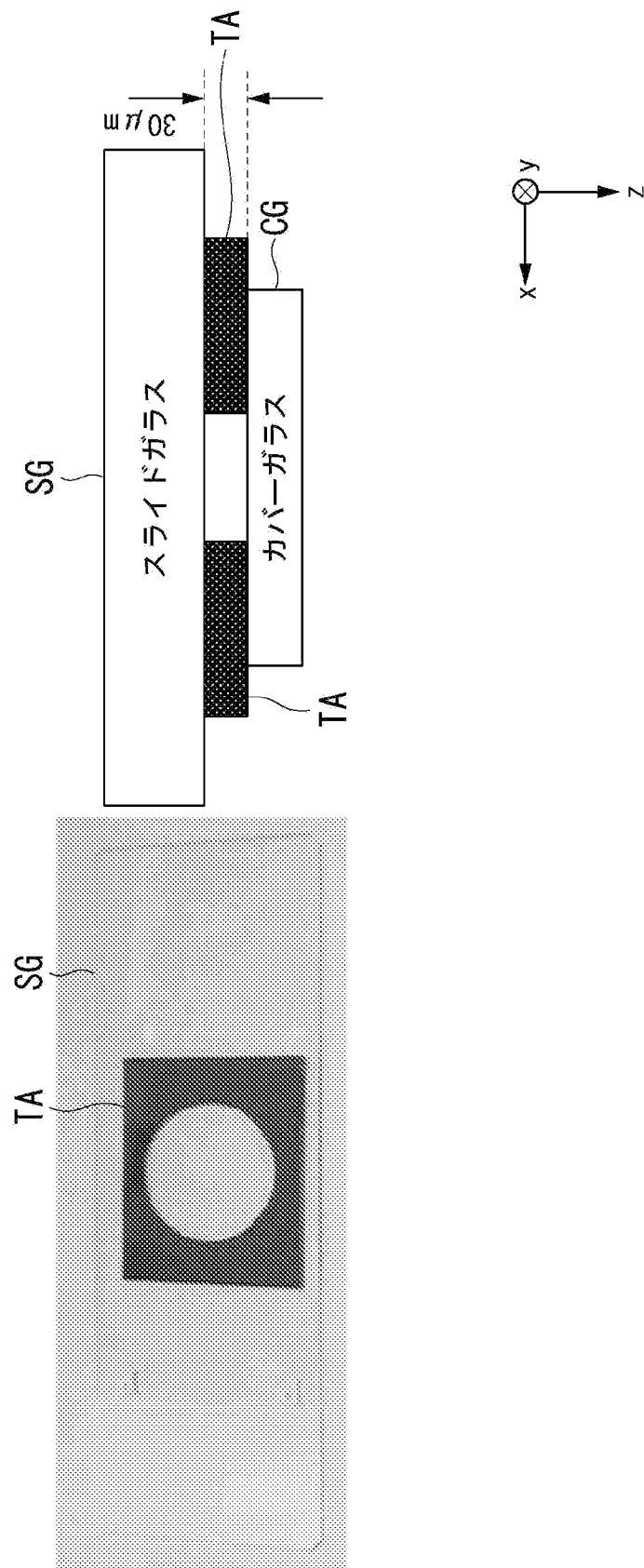
(A)



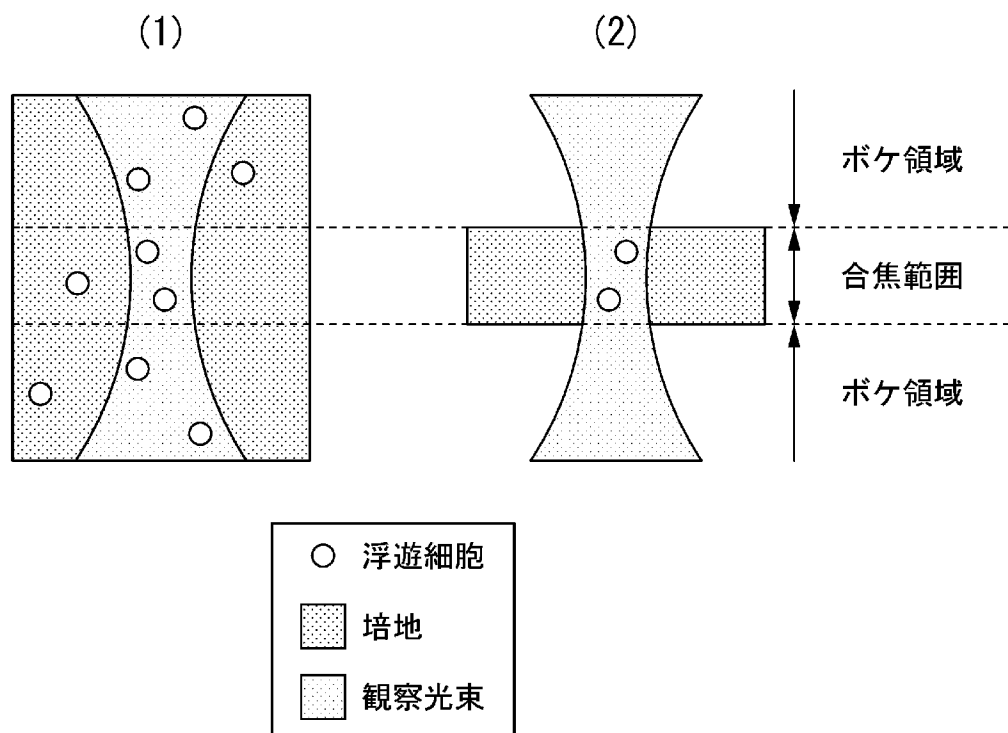
(B)



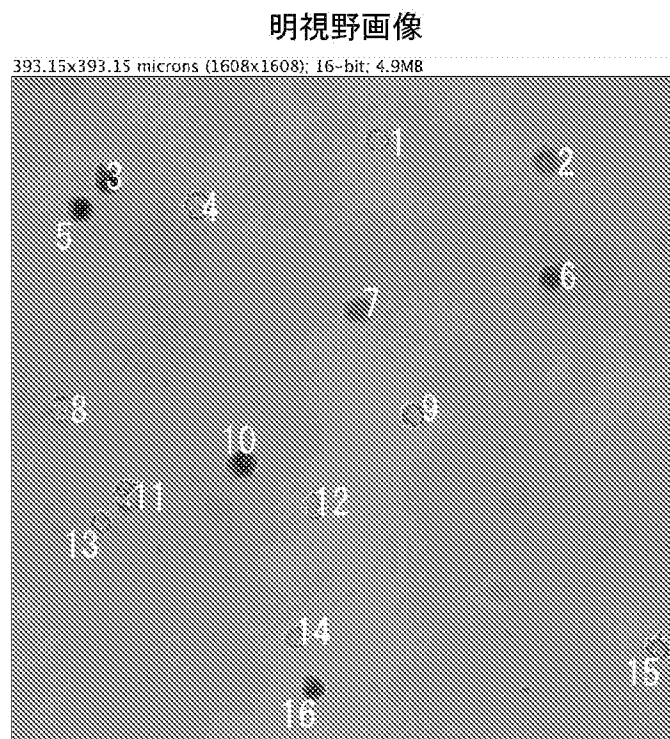
[図8A]



[図8B]

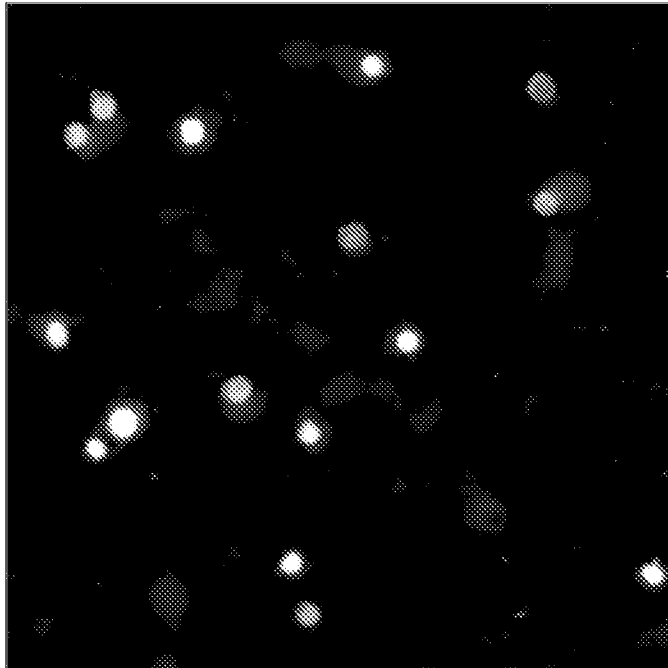


[図9]



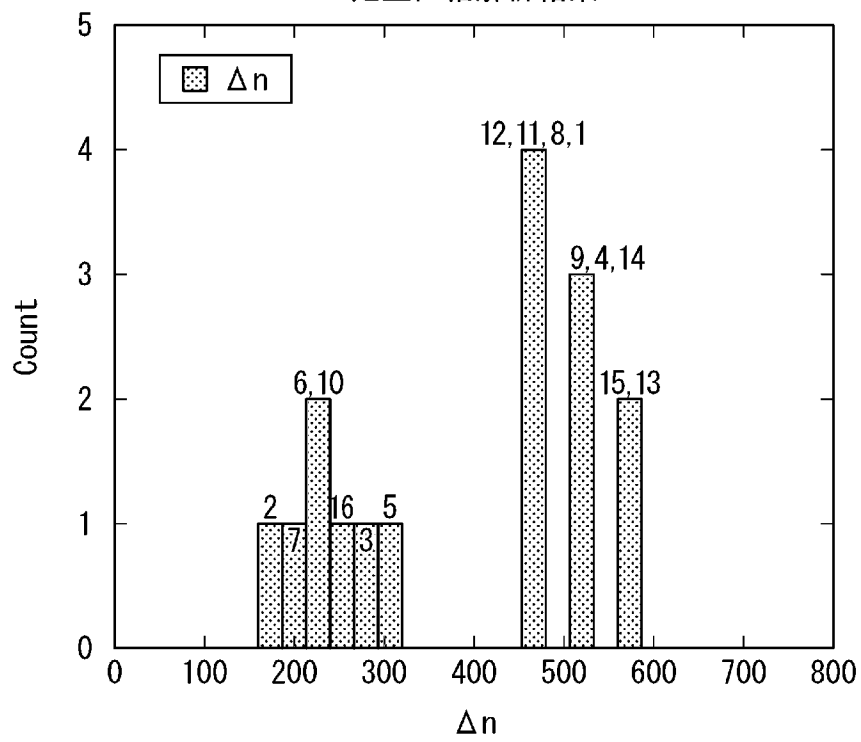
[図10]

定量位相画像

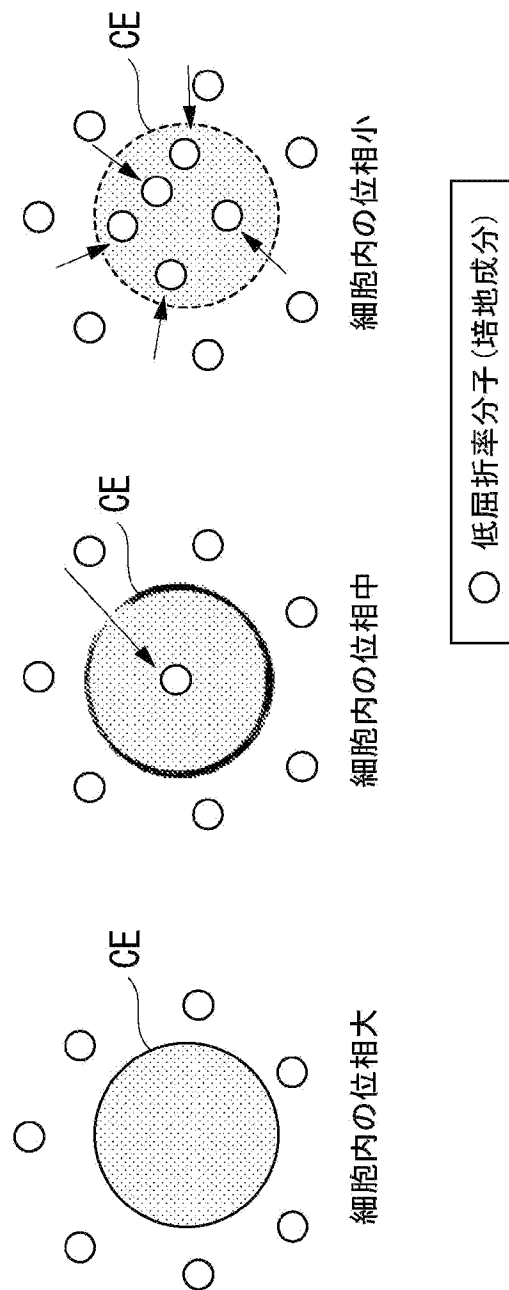


[図11]

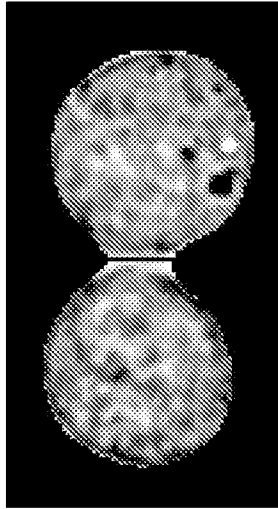
定量位相解析結果



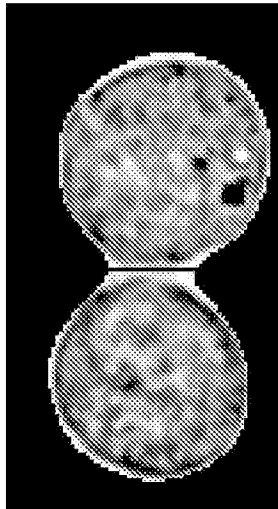
[図12]



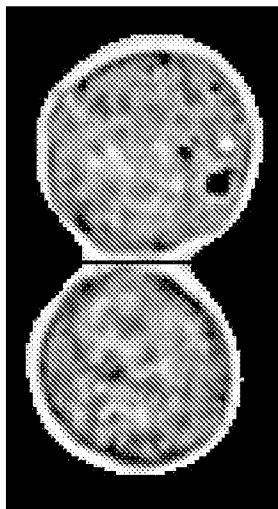
[図13]



閾値1000で生成した
マスクと明視野画像の
重ね合わせ画像

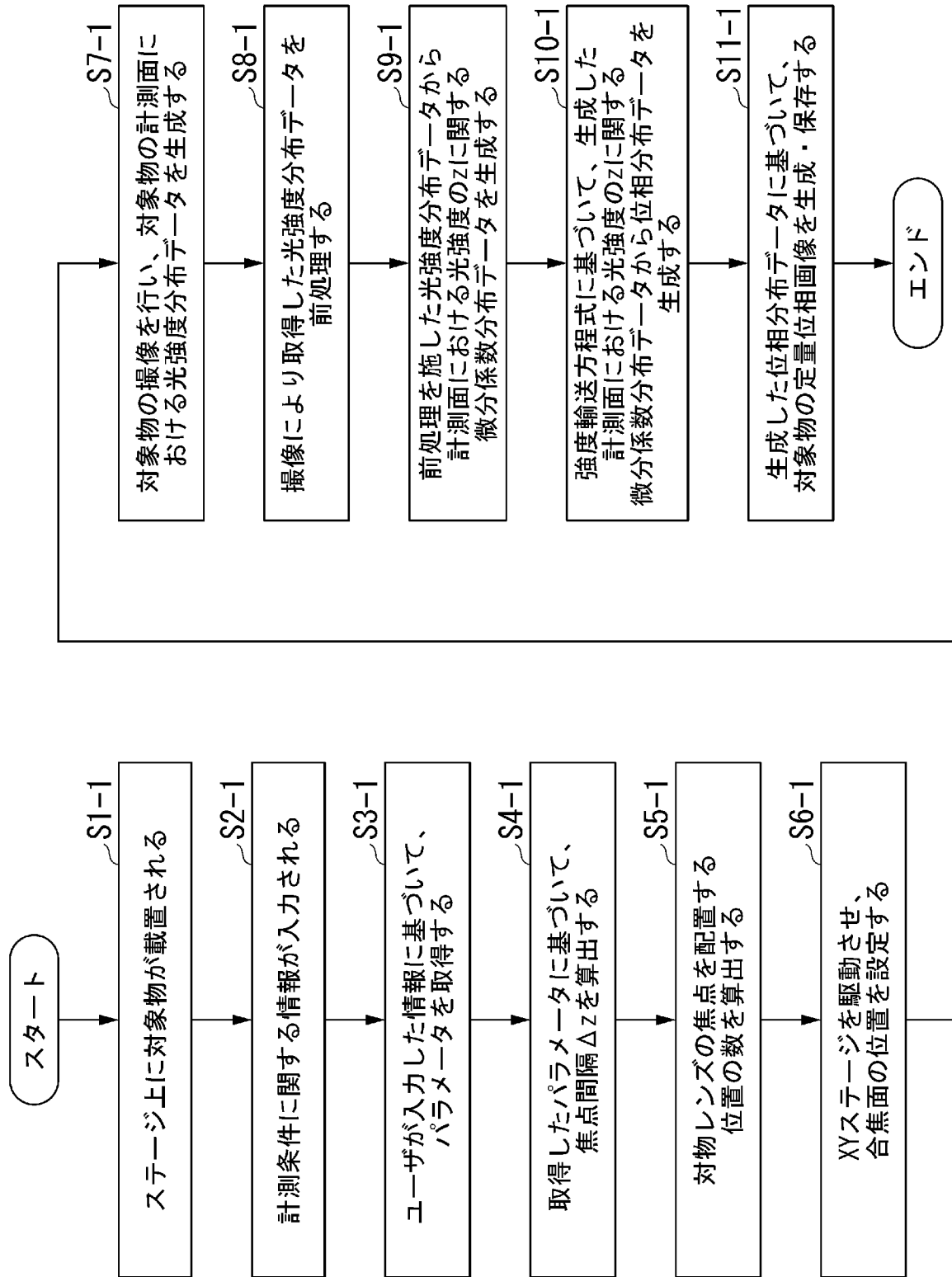


閾値750で生成した
マスクと明視野画像の
重ね合わせ画像

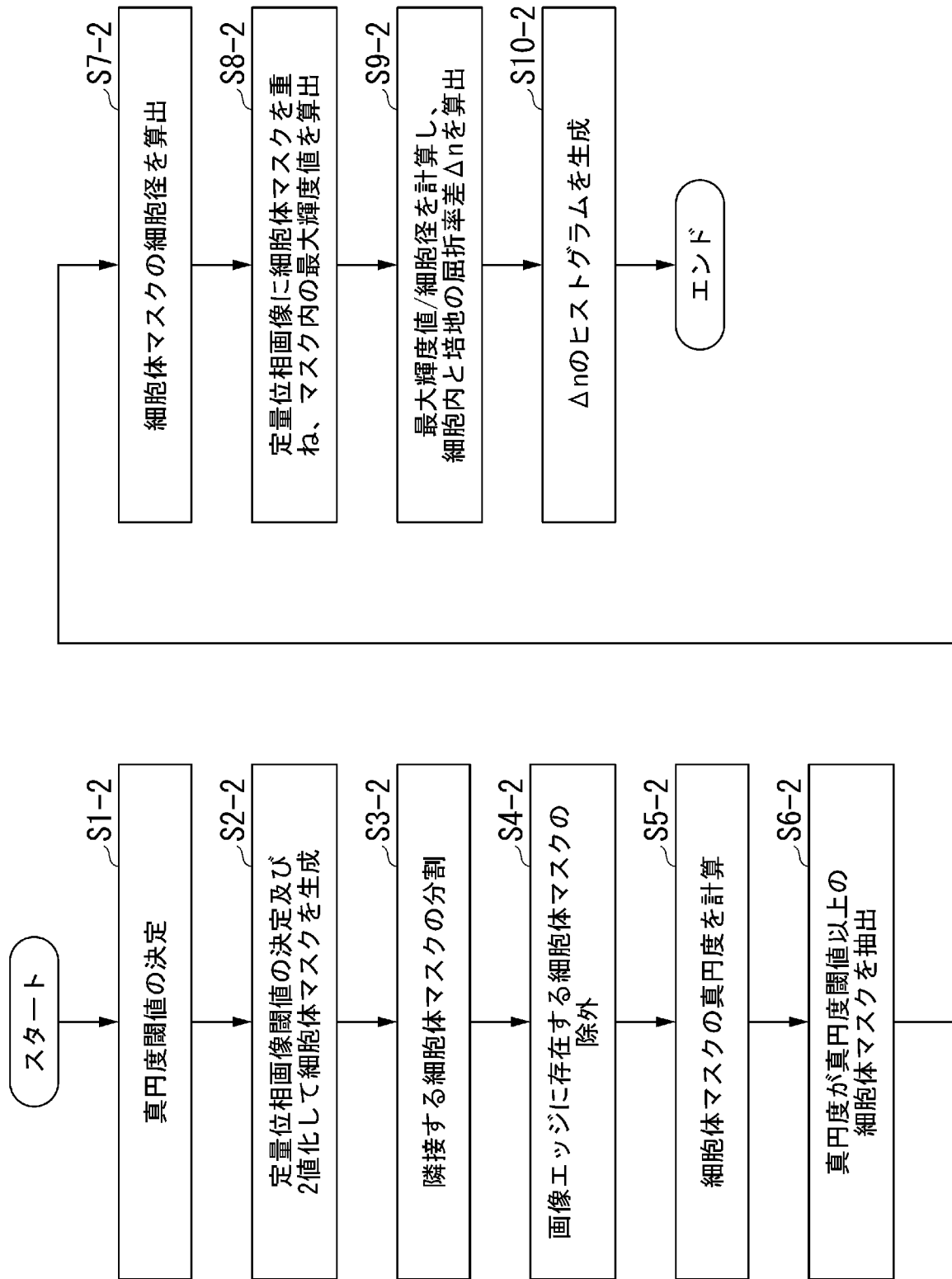


閾値500で生成した
マスクと明視野画像の
重ね合わせ画像

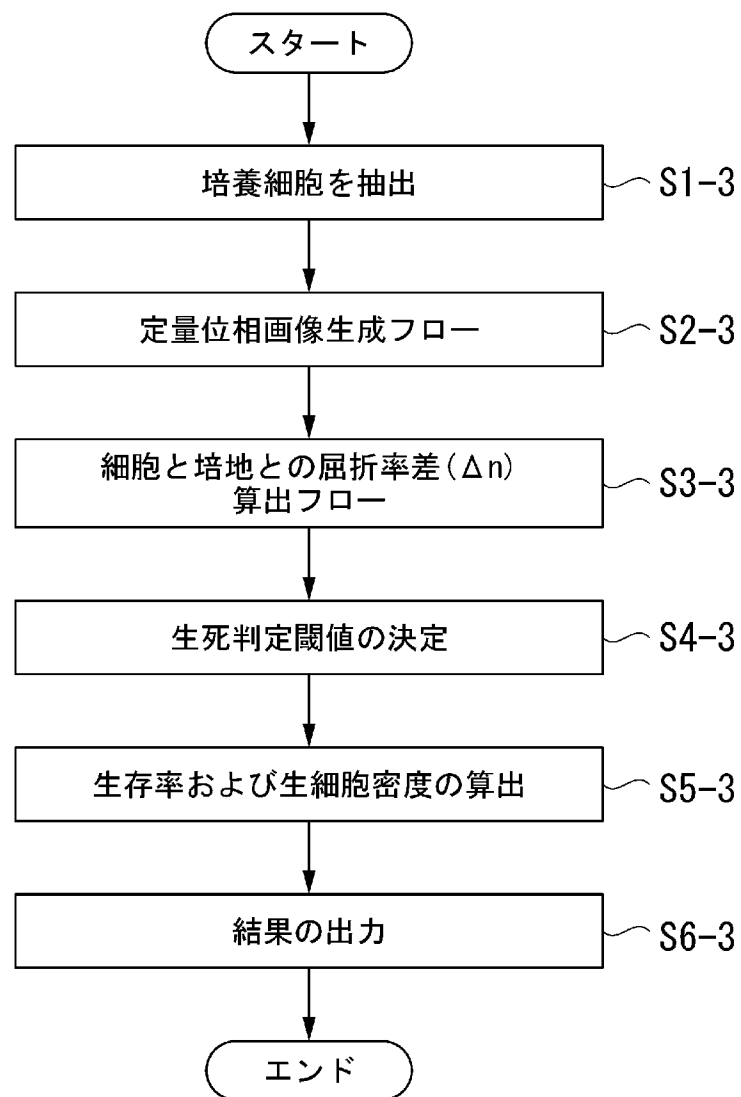
[図14]



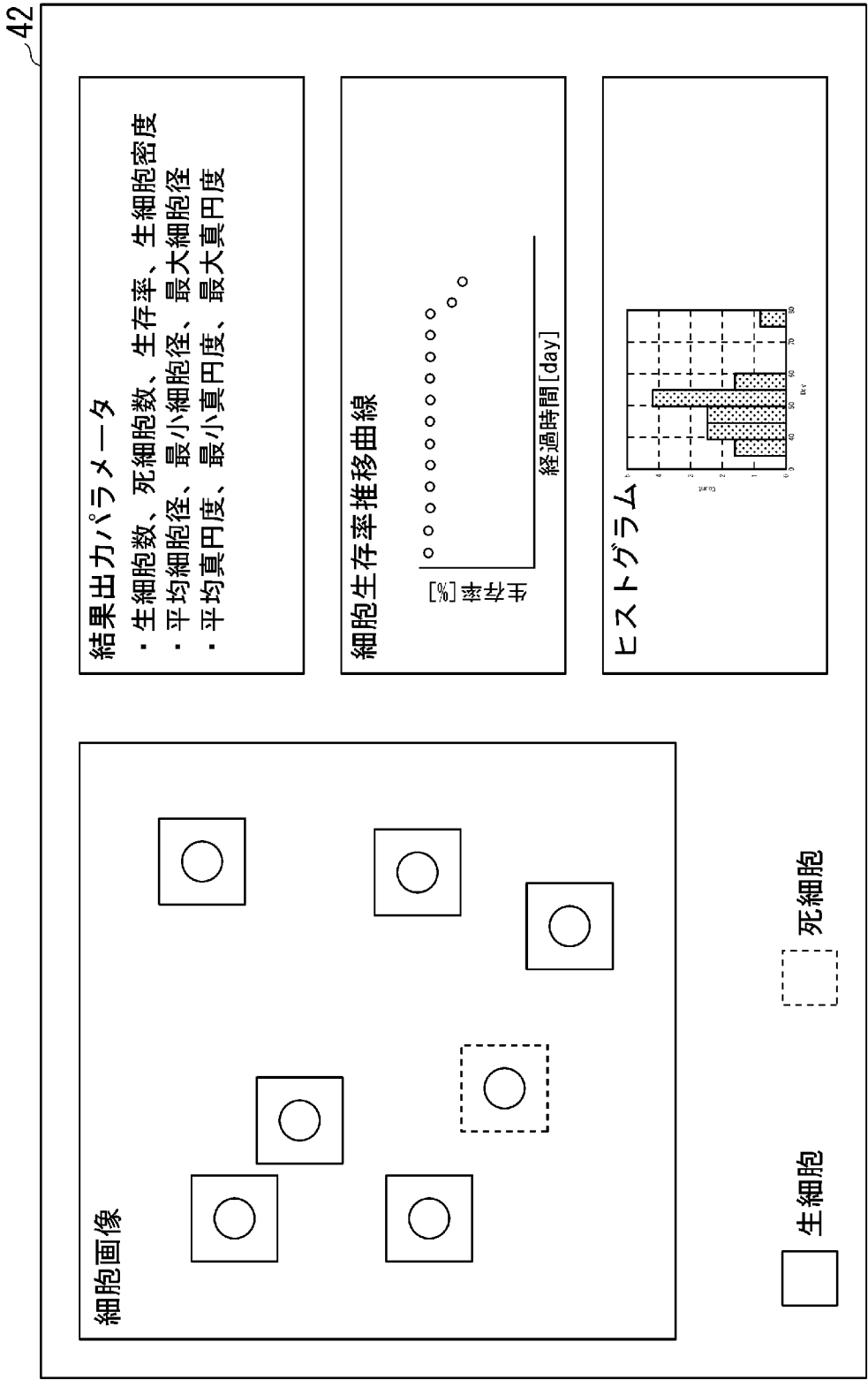
[図15]



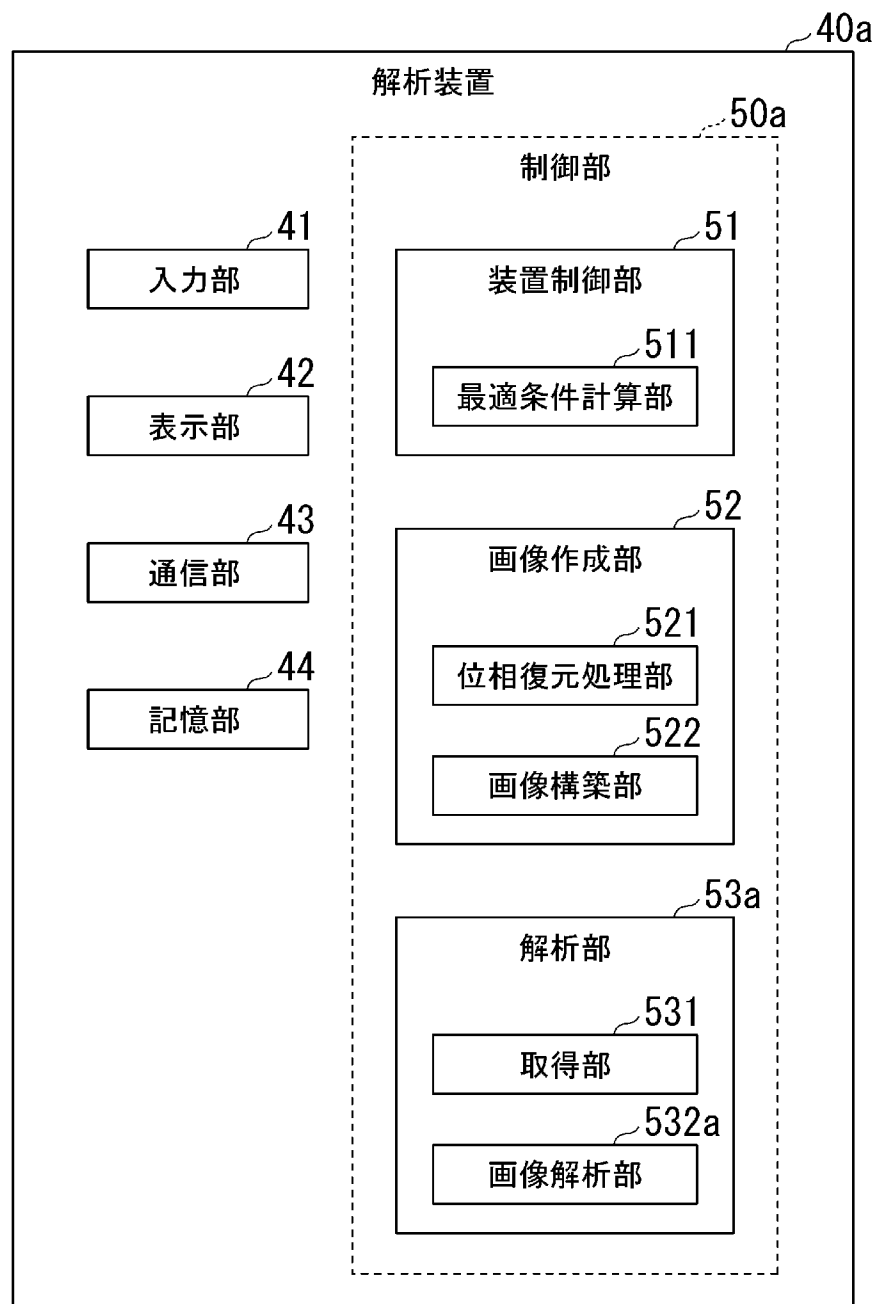
[図16]



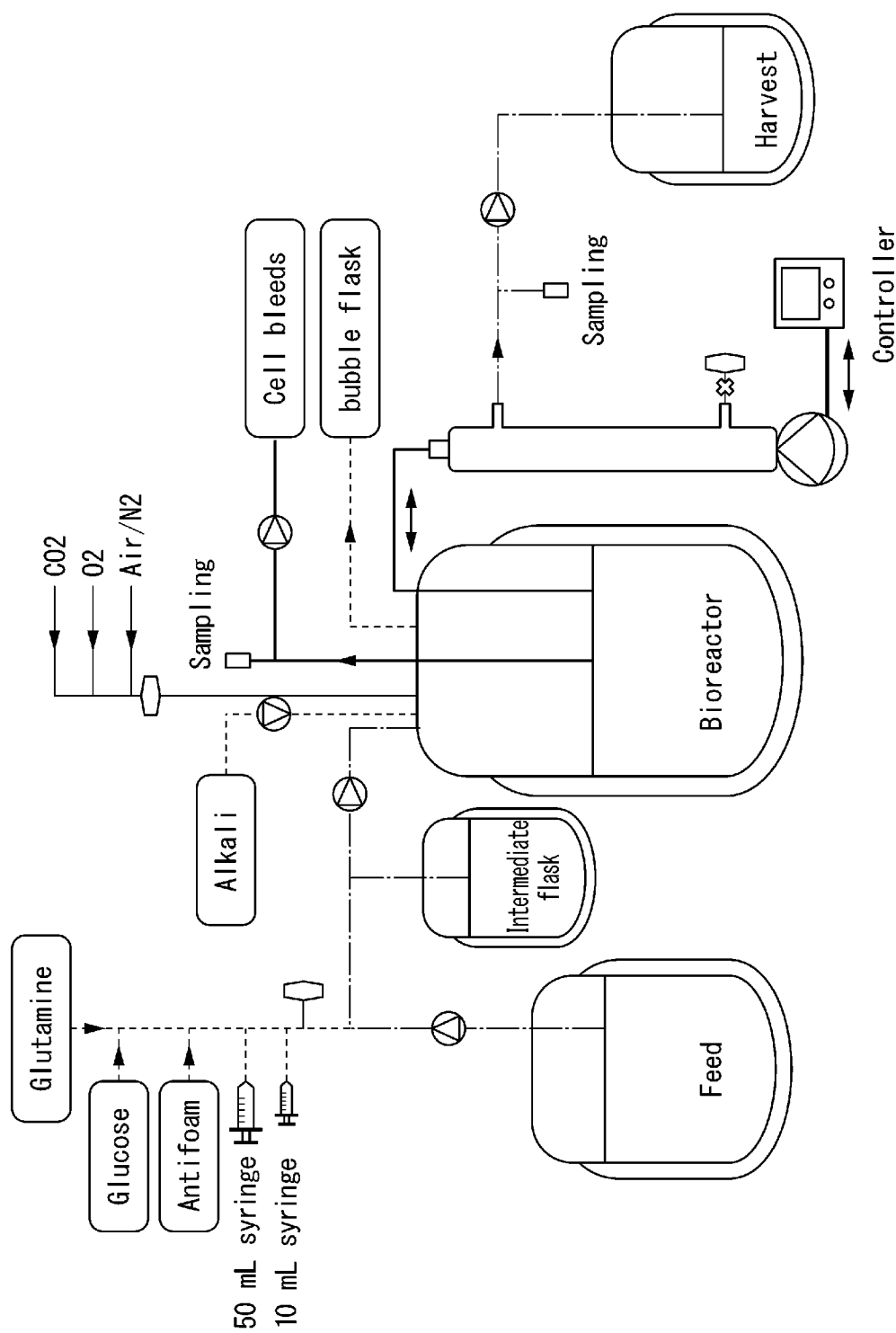
[図17]



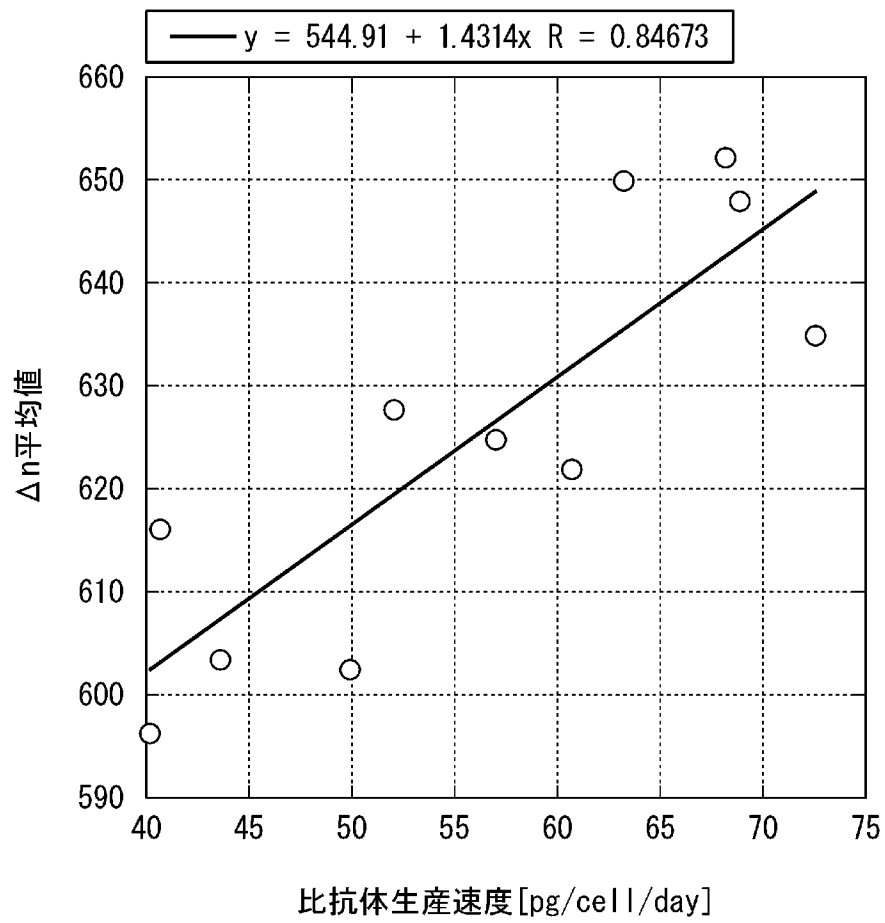
[図18]



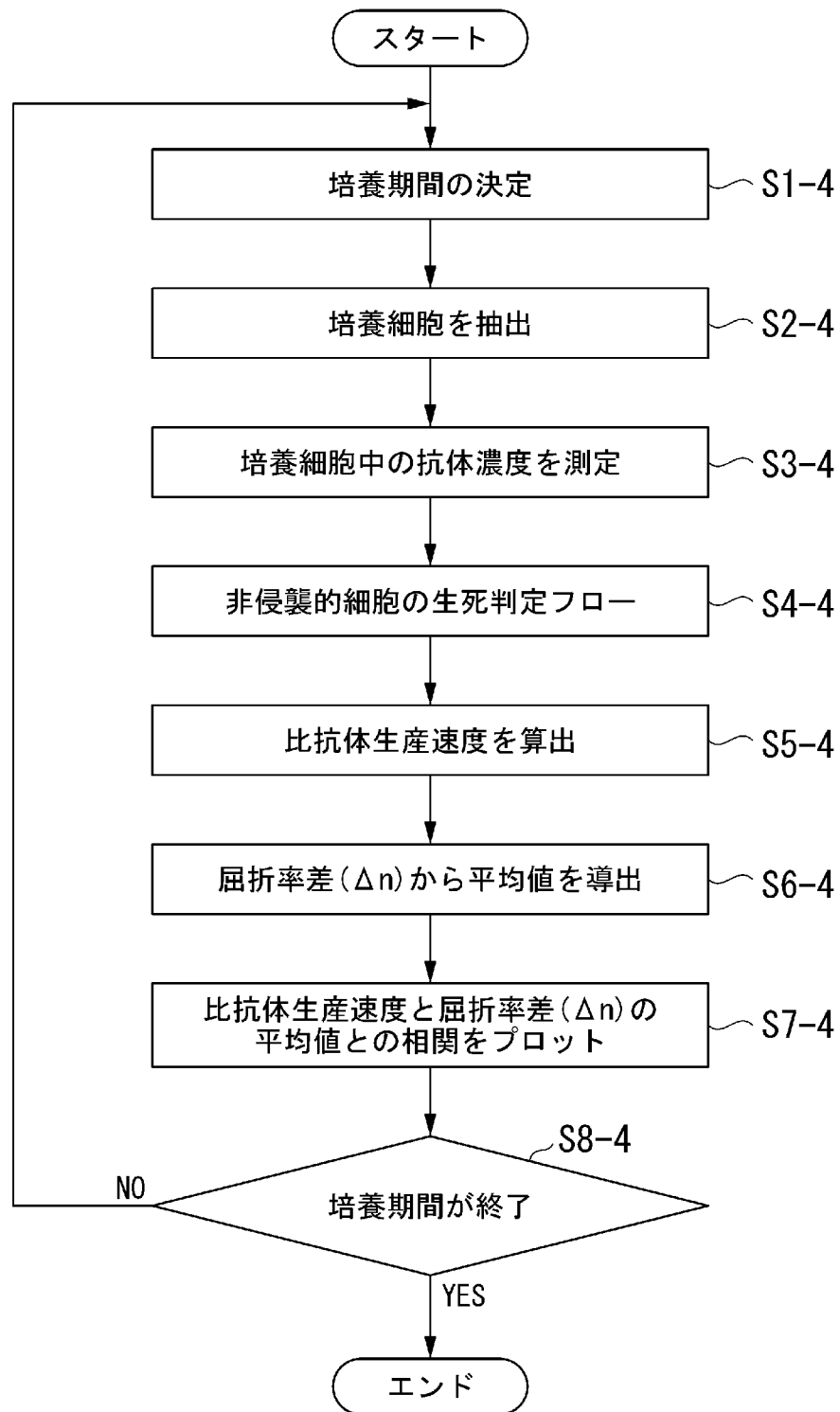
[図19]



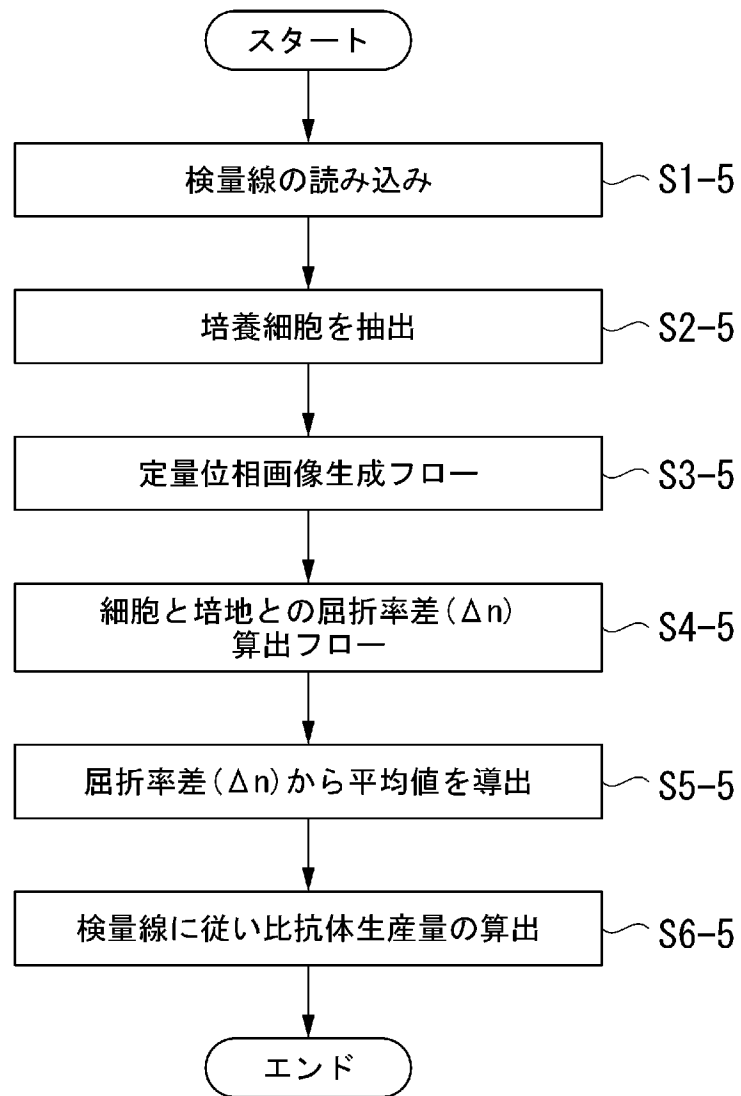
[図20]



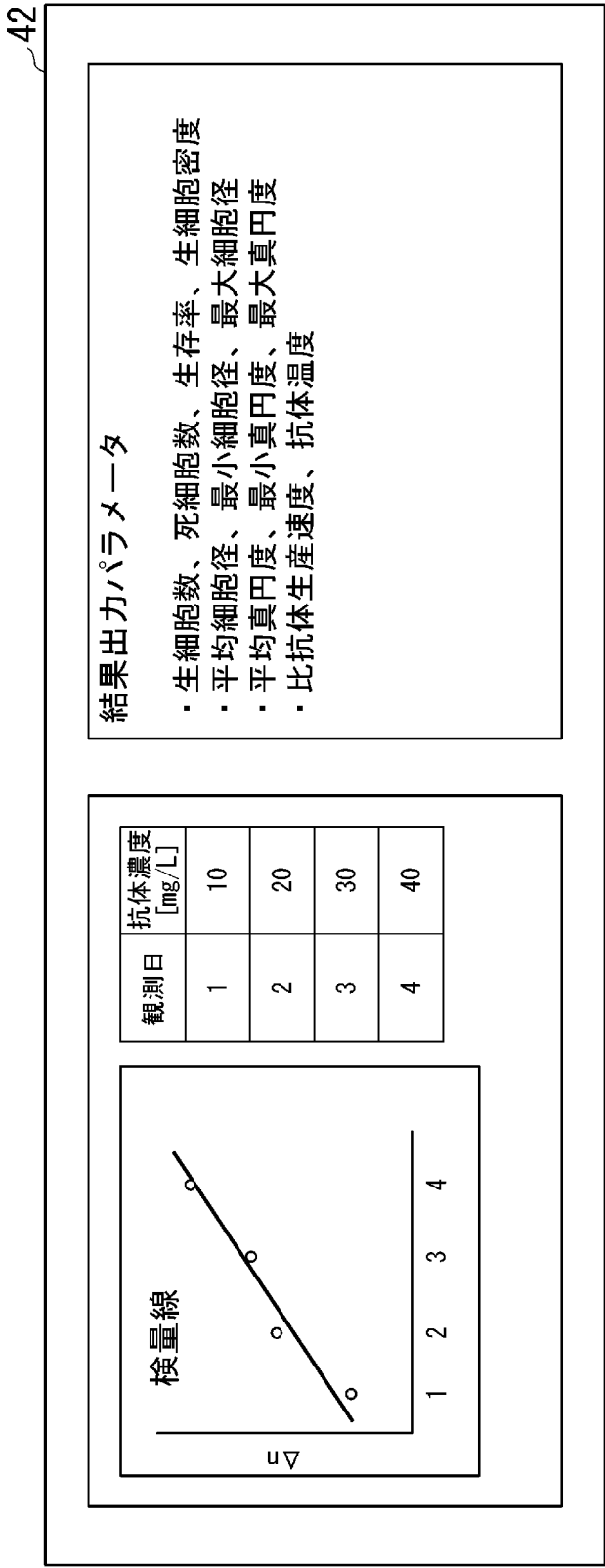
[図21]



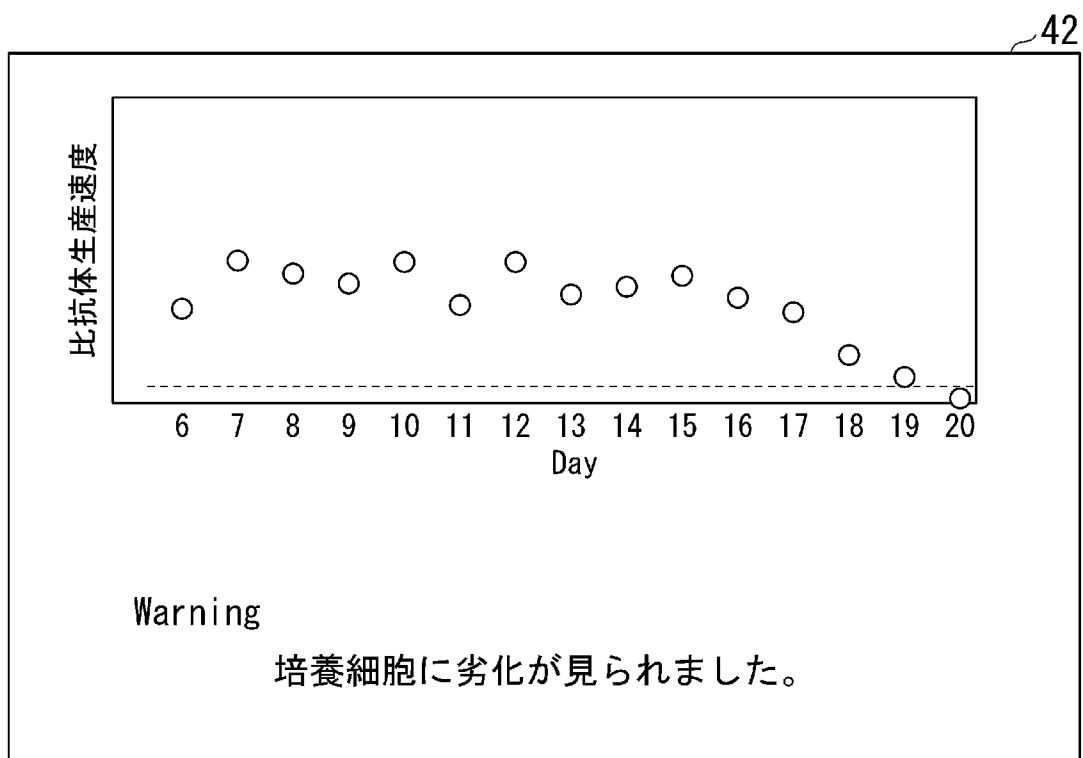
[図22]



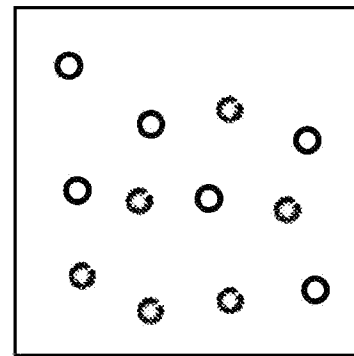
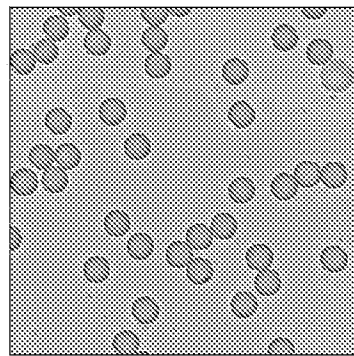
[図23]



[図24]



[図25]



○ 焦点深度内の細胞

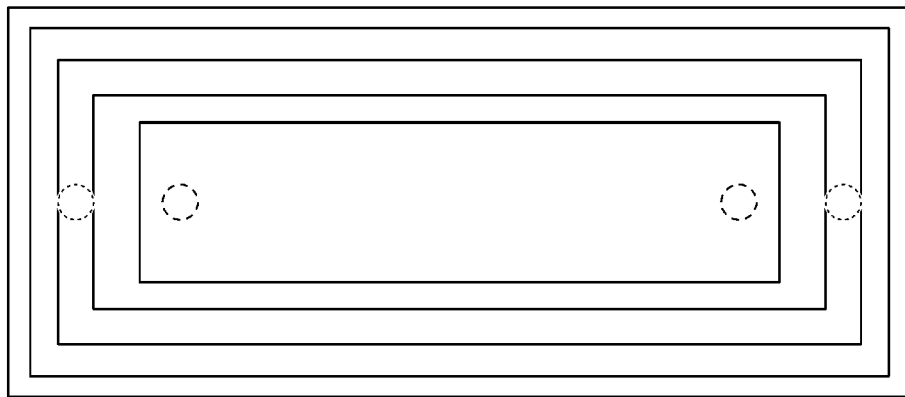
● 焦点深度外の細胞

[図26]

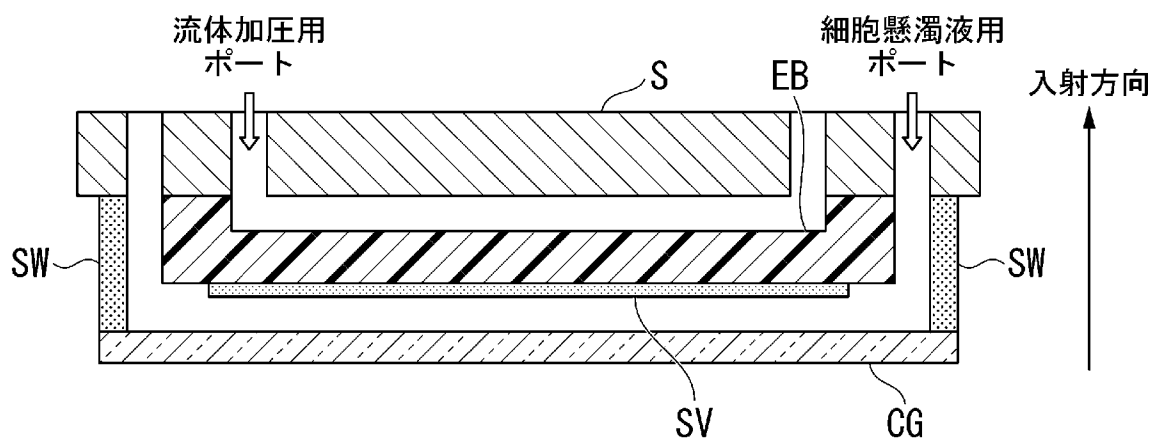
対物レンズ倍率	NA	焦点深度 [μm]
4X	0. 2	18. 2
10x	0. 45	3. 5
20x	0. 75	1. 2
40x	0. 95	0. 7
60x	1. 27	0. 3

[図27]

上面図

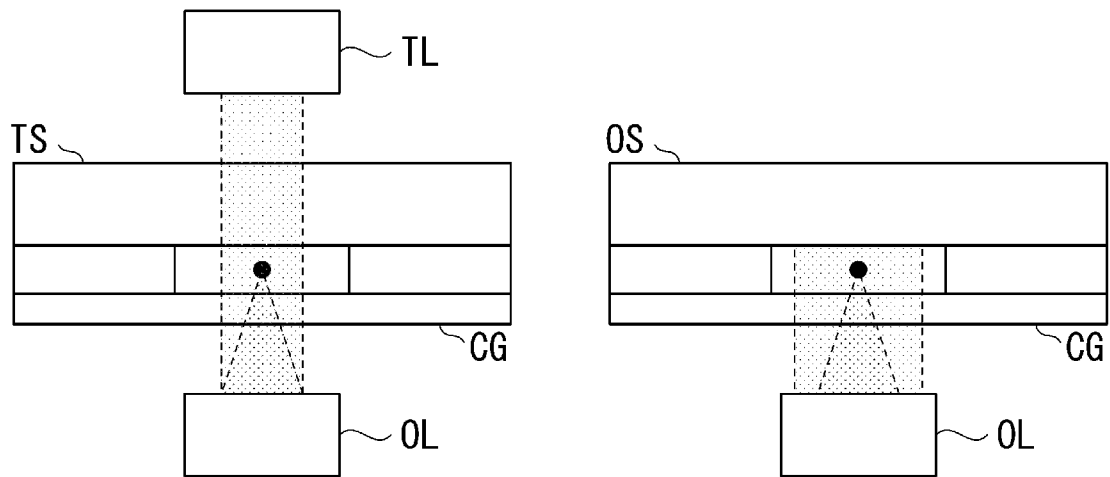


断面図

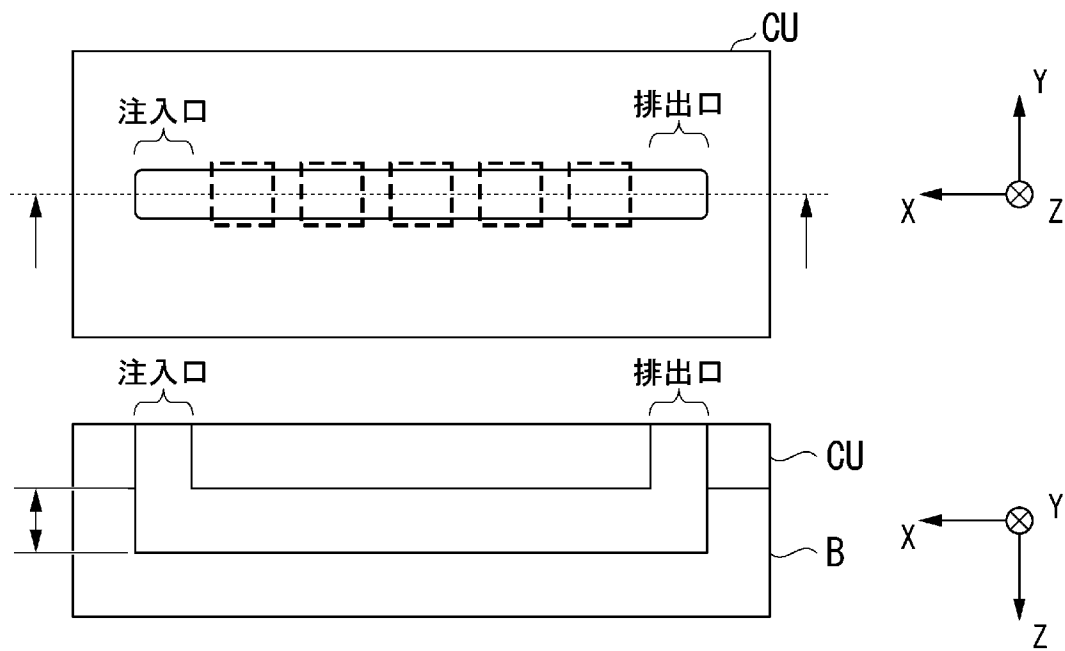


- | | |
|--|--------|
| | 基板 |
| | 隔壁 |
| | 弾性体 |
| | 遮蔽板 |
| | カバーガラス |

[図28]

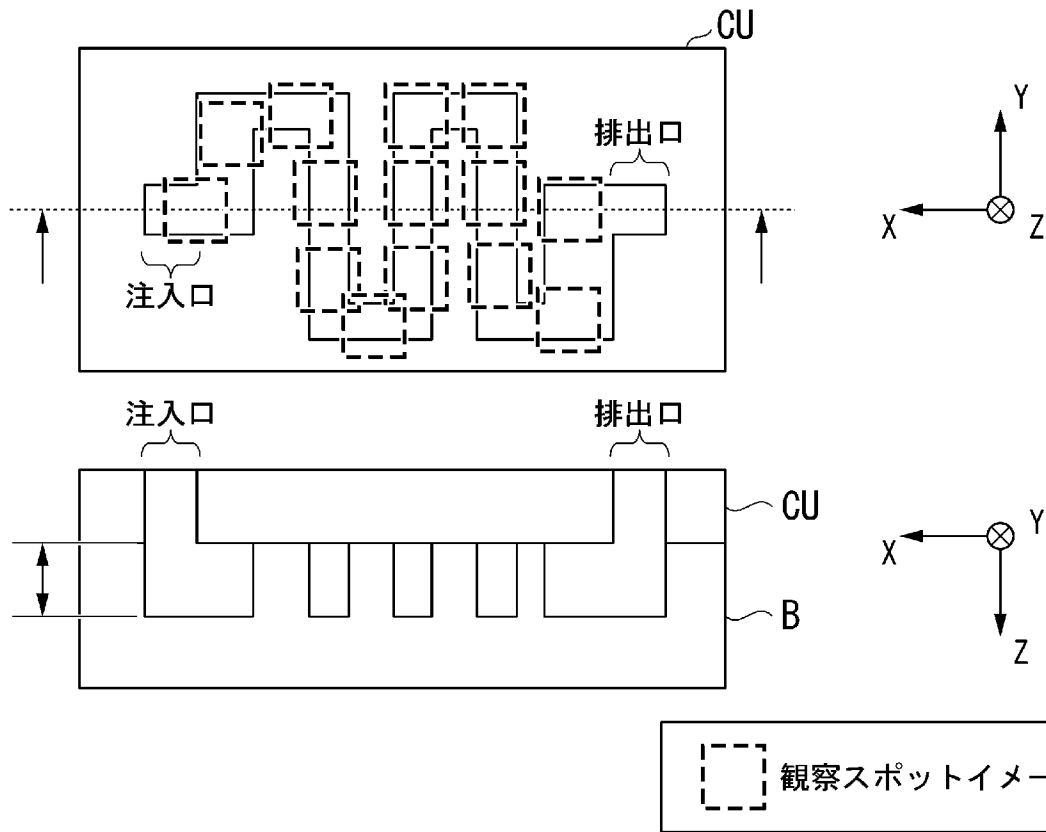


[図29A]

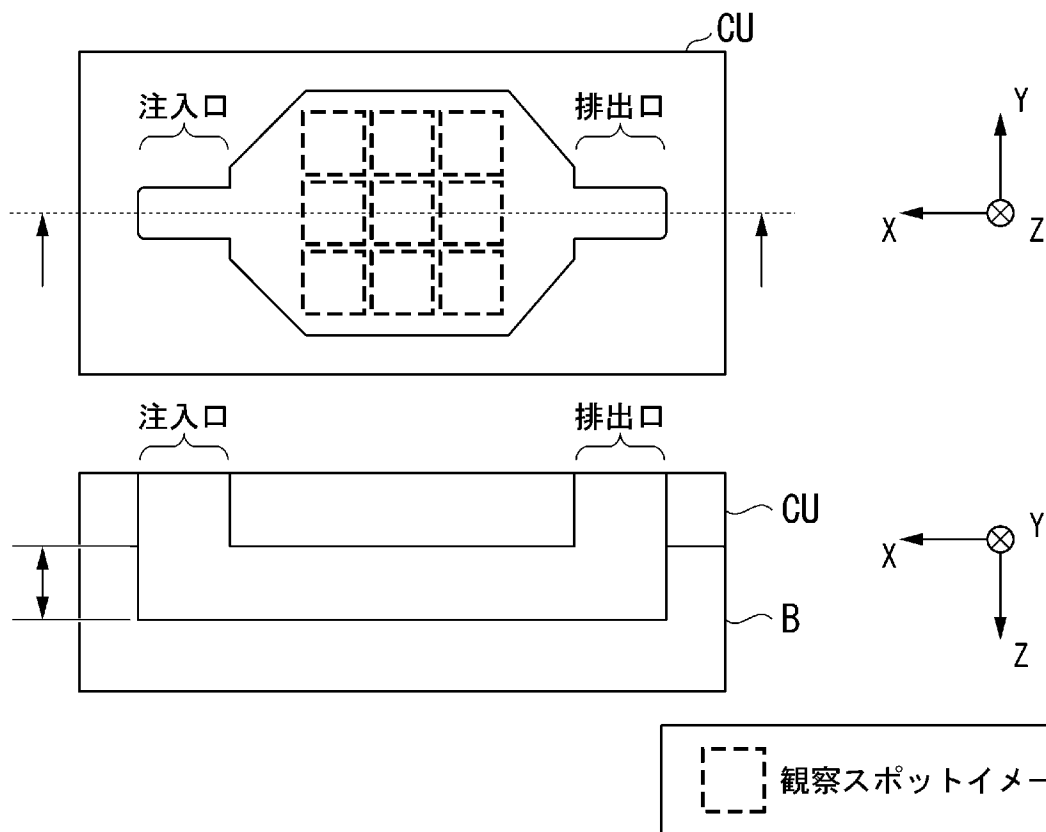


観察スポットイメージ

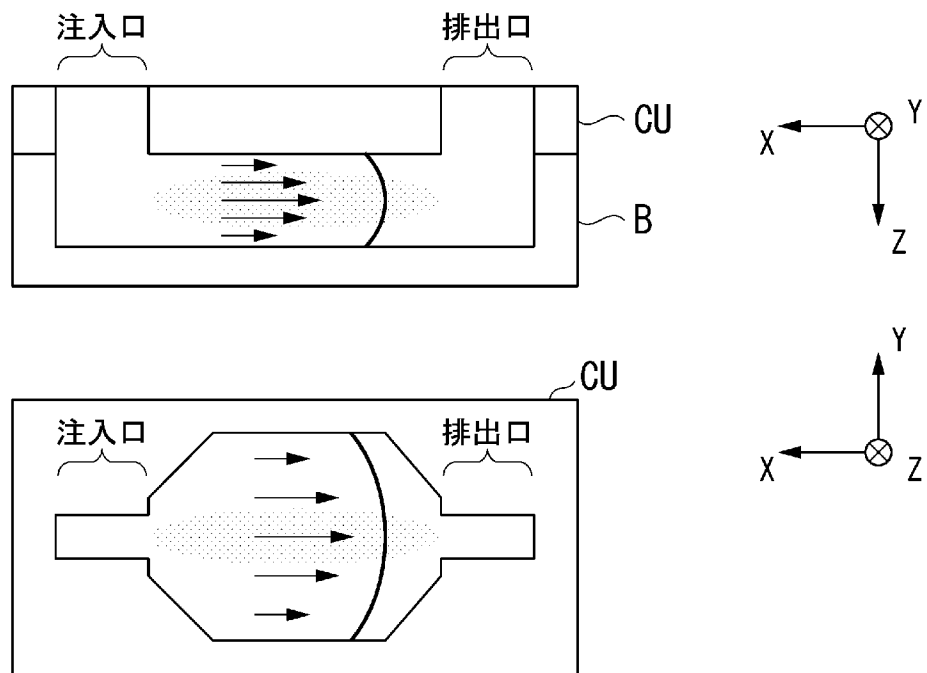
[図29B]



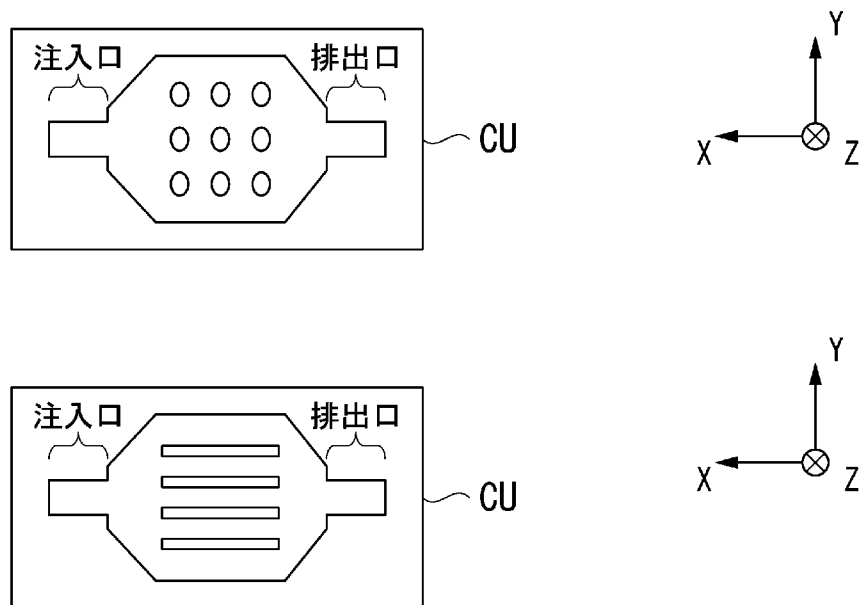
[図29C]



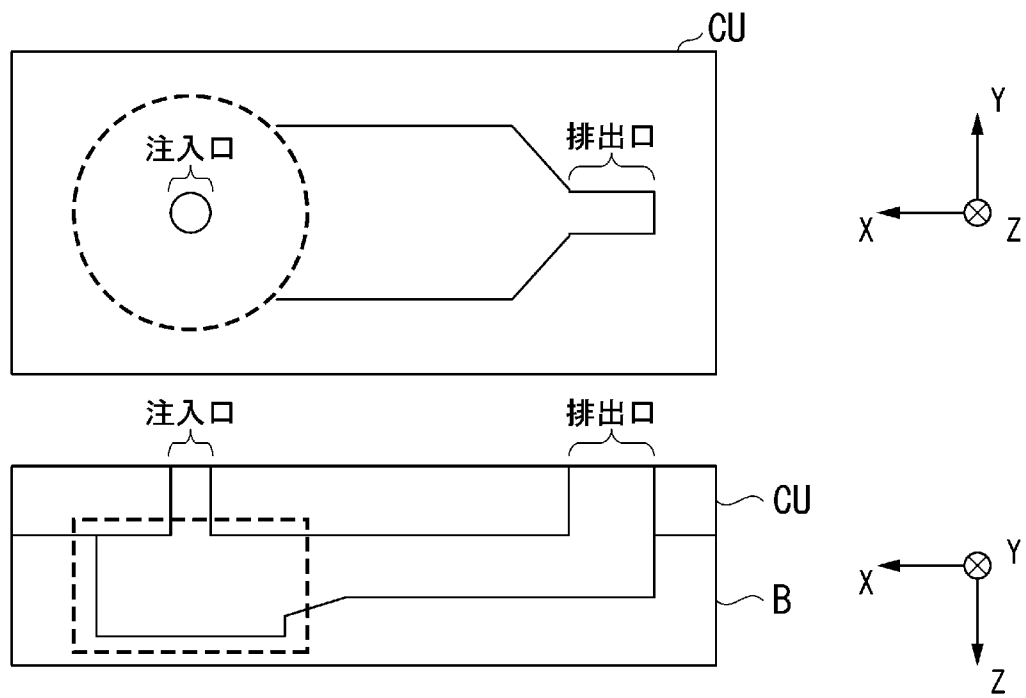
[図30A]



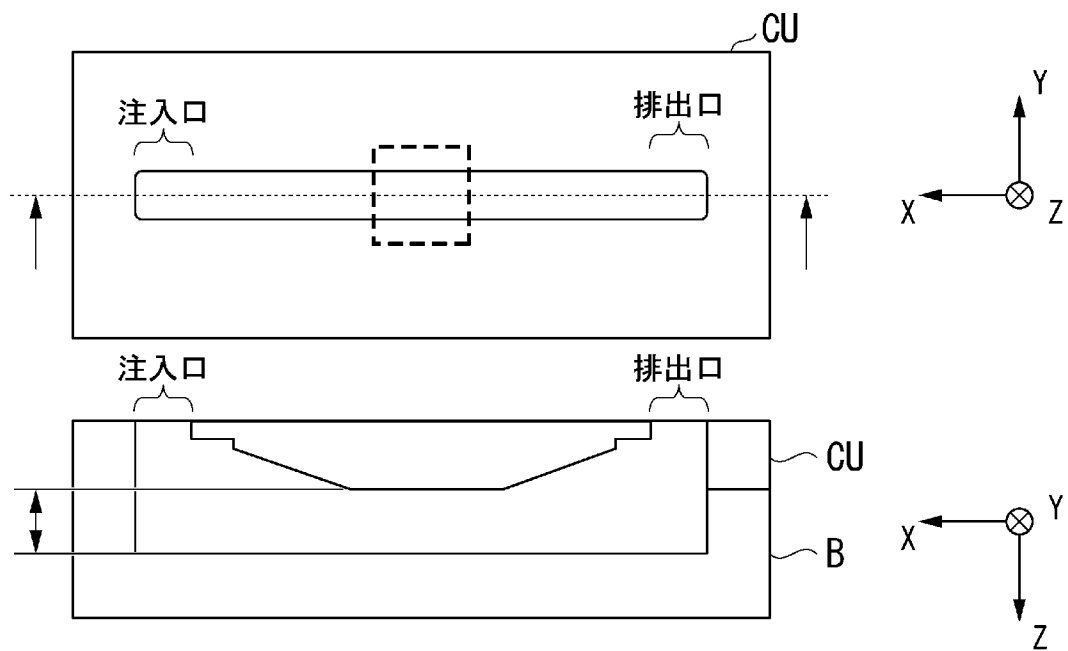
[図30B]



[図30C]

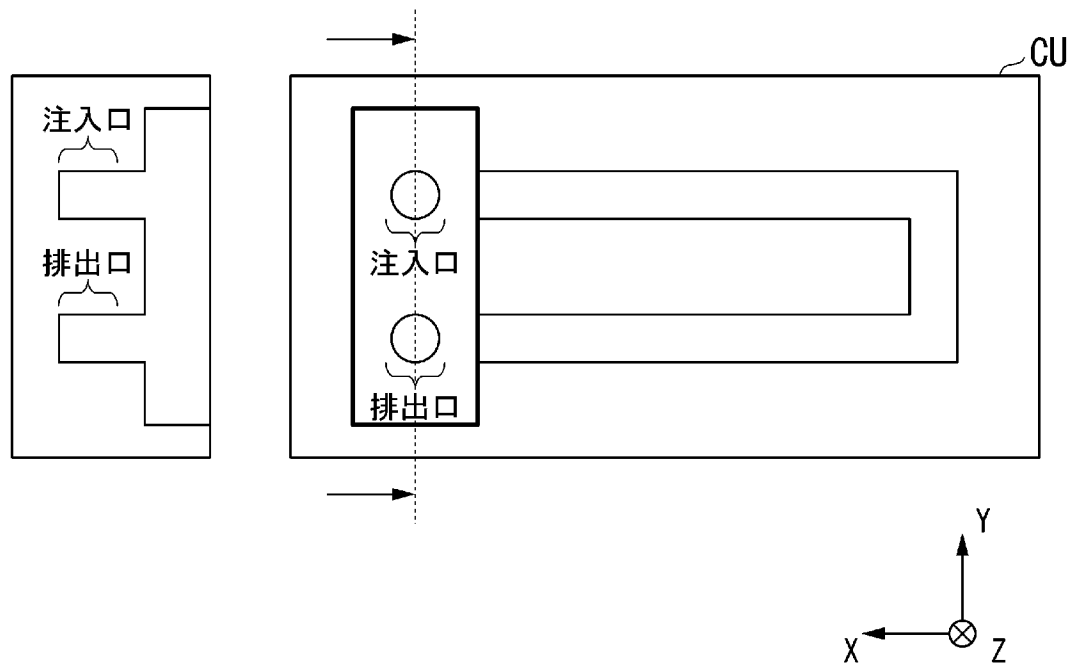


[図30D]

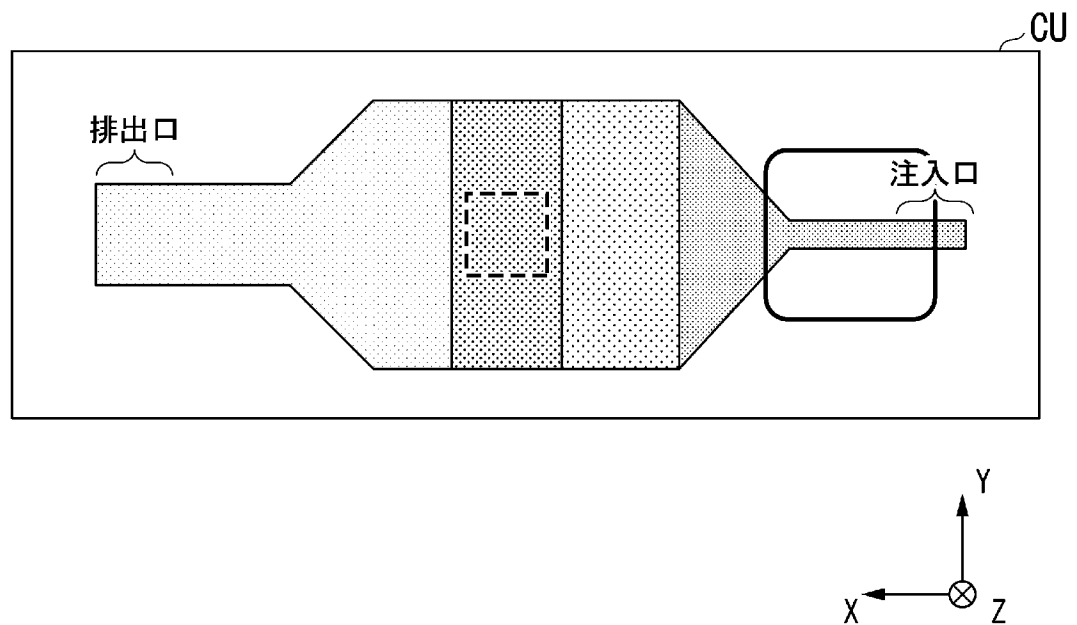


観察スポットイメージ

[図31]



[図32]



観察スポットイメージ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/030569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/34(2006.01)i; *C12M 1/00*(2006.01)i; *C12M 3/00*(2006.01)i; *C12Q 1/02*(2006.01)i; *G01J 9/02*(2006.01)i;
G01N 21/45(2006.01)i; *G01N 33/483*(2006.01)i
 FI: C12M1/34 A; C12M1/00 A; C12Q1/02; C12M3/00 Z; G01N21/45 A; G01J9/02; G01N33/483 C

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; C12M1/00; C12M3/00; C12Q1/02; G01J9/02; G01N21/45; G01N33/483

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-54742 A (SCREEN HOLDINGS CO., LTD.) 11 April 2019 (2019-04-11) claims 1, 4	1
Y	paragraph [0005]	1-10, 17-20
Y	JP 2021-89244 A (NIKON CORP.) 10 June 2021 (2021-06-10) claim 1, paragraphs [0060]-[0062], [0065], [0071]	1-10, 17-20
Y	JP 2010-276585 A (OLYMPUS CORP.) 09 December 2010 (2010-12-09) claims 1, 3, paragraph [0008]	1-10, 17-20
X	JP 2020-190459 A (NIKON CORP.) 26 November 2020 (2020-11-26) claims 1, 4, fig. 6	11-13, 16
X	JP 2020-188717 A (NIKON CORP.) 26 November 2020 (2020-11-26) claims 1, 6, fig. 7	11-13, 16
A	WO 2021/033750 A1 (WASEDA UNIV.) 25 February 2021 (2021-02-25) entire text, all drawings	1-20



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

03 October 2022

Date of mailing of the international search report

25 October 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/030569**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/063364 A1 (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORP.) 28 April 2016 (2016-04-28) entire text, all drawings	1-20
A	WO 2017/115863 A1 (TOPPAN PRINTING CO., LTD.) 06 July 2017 (2017-07-06) entire text, all drawings	1-20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-10 and 17-20

Claim 1 lacks novelty in light of document 1, and thus does not have a special technical feature. However, claims 2-10, which are dependent on claim 1, have the special technical feature of "deriving differences in refractive index between more than one cultured cell in a cell image and a medium", and claims 17-20 also share the technical feature with claims 2-10. Accordingly, claims 1-10 and 17-20 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 11-16

Claims 11-16 cannot be said to share a same or corresponding technical feature with claims 2-10 classified as invention 1.

Furthermore, claims 11-16 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claims 11-16 cannot be classified as invention 1.

Claims 11-16 are therefore classified as invention 2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/030569

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2019-54742	A	11 April 2019	(Family: none)	
JP	2021-89244	A	10 June 2021	(Family: none)	
JP	2010-276585	A	09 December 2010	(Family: none)	
JP	2020-190459	A	26 November 2020	(Family: none)	
JP	2020-188717	A	26 November 2020	(Family: none)	
WO	2021/033750	A1	25 February 2021	(Family: none)	
WO	2016/063364	A1	28 April 2016	US 2017/0306287 A1 entire text, all drawings CN 107075437 A	
WO	2017/115863	A1	06 July 2017	US 2018/0299380 A1 entire text, all drawings	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12M 1/34(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01J 9/02(2006.01)i; G01N 21/45(2006.01)i; G01N 33/483(2006.01)i FI: C12M1/34 A; C12M1/00 A; C12Q1/02; C12M3/00 Z; G01N21/45 A; G01J9/02; G01N33/483 C		
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）） C12M1/34; C12M1/00; C12M3/00; C12Q1/02; G01J9/02; G01N21/45; G01N33/483		
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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)		
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 2019-54742 A (株式会社SCREENホールディングス) 11.04.2019 (2019-04-11)	1
Y	請求項1、4 段落0005	1-10, 17-20
Y	JP 2021-89244 A (株式会社ニコン) 10.06.2021 (2021-06-10) 請求項1、段落0060-0062、0065、0071	1-10, 17-20
Y	JP 2010-276585 A (オリンパス株式会社) 09.12.2010 (2010-12-09) 請求項1、3、段落0008	1-10, 17-20
X	JP 2020-190459 A (株式会社ニコン) 26.11.2020 (2020-11-26) 請求項1、4、図6	11-13, 16
X	JP 2020-188717 A (株式会社ニコン) 26.11.2020 (2020-11-26) 請求項1、6、図7	11-13, 16
A	WO 2021/033750 A1 (学校法人早稲田大学) 25.02.2021 (2021-02-25) 全文、全図	1-20
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 03.10.2022		国際調査報告の発送日 25.10.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 田中 晴絵 4N 9739 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
A	WO 2016/063364 A1 (株式会社日立ハイテクノロジーズ) 28.04.2016 (2016 - 04 - 28) 全文、全図	1-20
A	WO 2017/115863 A1 (凸版印刷株式会社) 06.07.2017 (2017 - 07 - 06) 全文、全図	1-20

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明１）請求項１～１０、１７～２０

請求項１は、文献１により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項１の従属請求項である請求項２～１０は、「細胞画像に含まれる複数の培養細胞と培地との屈折率差を導出する」という特別な技術的特徴を有しており、請求項１７～２０も、請求項２～１０と同一の技術的特徴を有している。したがって、請求項１～１０、１７～２０を発明１に区分する。

（発明２）請求項１１～１６

請求項１１～１６は、発明１に区分された請求項２～１０と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。

さらに、請求項１１～１６は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項１１～１６は発明１に区分できない。

よって、請求項１１～１６を発明２に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/030569

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2019-54742	A	11.04.2019	(ファミリーなし)	
JP	2021-89244	A	10.06.2021	(ファミリーなし)	
JP	2010-276585	A	09.12.2010	(ファミリーなし)	
JP	2020-190459	A	26.11.2020	(ファミリーなし)	
JP	2020-188717	A	26.11.2020	(ファミリーなし)	
WO	2021/033750	A1	25.02.2021	(ファミリーなし)	
WO	2016/063364	A1	28.04.2016	US 2017/0306287	A1
				全文、全図	
				CN 107075437	A
WO	2017/115863	A1	06.07.2017	US 2018/0299380	A1
				全文、全図	