

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7026853号  
(P7026853)

(45)発行日 令和4年2月28日(2022.2.28)

(24)登録日 令和4年2月17日(2022.2.17)

(51)国際特許分類		F I		
G 0 1 N	15/14 (2006.01)	G 0 1 N	15/14	D
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	A
G 0 1 N	21/17 (2006.01)	G 0 1 N	21/17	A
G 0 3 H	1/22 (2006.01)	G 0 3 H	1/22	

請求項の数 8 (全27頁)

(21)出願番号	特願2021-527485(P2021-527485)	(73)特許権者	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(86)(22)出願日	令和2年5月21日(2020.5.21)	(74)代理人	110001519 特許業務法人太陽国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/020027	(72)発明者	中村 崇市郎 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
(87)国際公開番号	WO2020/261826	(72)発明者	小野澤 祥 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)	(72)発明者	大崎 龍介 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内
審査請求日	令和3年12月21日(2021.12.21)	審査官	福田 裕司
(31)優先権主張番号	特願2019-122482(P2019-122482)		
(32)優先日	令和1年6月28日(2019.6.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 画像処理装置、評価システム、画像処理プログラム及び画像処理方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得する取得部と、  
前記ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、前記ホログラムから生成する生成部と、  
前記位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、前記複数の粒状体の各々に対応する、前記光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定する特定部と、  
前記複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の前記光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する抽出部と、  
を含む画像処理装置。

## 【請求項2】

前記特定部は、  
前記位相差画像の少なくとも一部を加算平均した加算平均画像を、前記平均化画像として生成する加算平均画像生成部と、  
前記加算平均画像における前記粒状体の外縁に対応する輪郭線からの距離が、周囲の他の点よりも長くなる各点を中心とし、前記輪郭線に内接する複数の内接円を導出する内接円導出部と、  
前記内接円の各々について膨張処理を施す膨張処理部と、  
を含む

請求項 1 に記載の画像処理装置。

【請求項 3】

前記抽出部は、前記光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像のうち、画素間の位相差量のばらつきが最大となるものを、前記粒状体の前記光軸方向の中心位置における位相差画像として抽出する

請求項 1 または請求項 2 に記載の画像処理装置。

【請求項 4】

前記粒状体は、複数の細胞の凝集体である

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の画像処理装置。

【請求項 5】

複数の粒状体を撮像視野内に収めたホログラムを撮像する撮像装置と、

前記ホログラムに対する画像処理を行う画像処理装置と、

前記画像処理装置によって得られた画像に基づいて、前記複数の粒状体の各々について評価結果を出力する評価装置と、を含み、

前記画像処理装置は、

前記ホログラムを取得する取得部と、

前記ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、前記ホログラムから生成する生成部と、

前記位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、前記複数の粒状体の各々に対応する、前記光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定する特定部と、

前記複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の前記光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する抽出部と、

を含み、

前記評価装置は、前記抽出部によって抽出された位相差画像を用いて前記評価結果を導出する

評価システム。

【請求項 6】

前記複数の粒状体が流動する流路を更に含み、

前記撮像装置は、前記撮像視野内に前記流路の幅方向の全域が収まるように設置されている

請求項 5 に記載の評価システム。

【請求項 7】

複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得し、

前記ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、前記ホログラムから生成し、

前記位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、前記複数の粒状体の各々に対応する、前記光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定し、前記複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の前記光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する

処理をコンピュータに実行させるための画像処理プログラム。

【請求項 8】

複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得し、

前記ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、前記ホログラムから生成し、

前記位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、前記複数の粒状体の各々に対応する、前記光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定し、前記複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の前記光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する

画像処理方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

開示の技術は、画像処理装置、評価システム、画像処理プログラム及び画像処理方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞の状態を評価または判定する技術として、例えば、以下の技術が知られている。例えば、特許文献1には、マイクロ流体チャネル内を連続的に流れる複数の細胞の、3Dホログラフィックによるイメージングシステムが記載されている。このイメージングシステムにおいて、レーザビームが線を通る複数の細胞から散乱される複数の角スペクトルを測定するのに使用され、マイクロ流体チャネル内の線に焦点が合わせられる。複数の複素散乱場の測定については、標本の各位置に対する場のワンショット記録を可能にすべく、軸外デジタルホログラフィが使用される。細胞タンプリングを減少させ、高NA集光レンズおよび対物レンズの使用を可能にするよう構成されたマイクロ流体チャネルが、システムの実視野にわたり、物質を運搬するのに使用される。データ再構成については、複数の細胞内の複数の焦点がぼけた細胞器官から生じる、複数の回折アーティファクトを減少させ、入射ビームの限定的な角度範囲による複数のアーティファクトを減少すべく、反復的な制約手順を適用するために、光回折断層撮影が使用される。

10

## 【0003】

特許文献2には、流れる媒体中に浸漬された物体を選別するためのデバイスが記載されている。このデバイスは、ホログラフィック撮像ユニットと、複数のマイクロ流体チャネルを含む流体ハンドリングユニットとを備える。マイクロ流体チャネルは、流れる媒体中に浸漬された移動物体を撮像するために、対応するホログラフィック撮像素子に沿って流れる媒体を案内するための撮像領域を含む。マイクロ流体チャネルは、複数の出口のうち選択した1つに、流れる媒体中の各物体を制御可能に方向付けるために、撮像領域の下流に配置されたマイクロ流体スイッチを含む。このデバイスは、撮像領域のいずれかを通過する際、物体の各々について得られるホログラフィック回折像のリアルタイム特性評価に適合した処理ユニットを備える。特性評価は、少なくとも1つの所定の物体タイプの痕跡を考慮するものであり、処理ユニットは、特性評価に回答して、撮像領域の下流にあるマイクロ流体スイッチを制御するように構成されている。

20

30

## 【0004】

特許文献3には、対象水中の生体微細物の個数を計測する水質検査システムが記載されている。この水質検査システムは、撮像素子が撮像した干渉縞のデータであるホログラムデータを処理するデータ処理部を備える。データ処理部は、取得した各ホログラムデータを再生することで生体微細物の個数を数えるものであって、各ホログラムデータについての像再生の際に生体微細物の像であると判断されたものの個数を数えるデータ処理を行う。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

【文献】特表2016-511435号公報

40

特表2015-500475号公報

特開2016-133466号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

細胞の大量生産が可能な培養手法として、細胞の凝集体であるスフェアを培地中に浮遊させた状態で培養する三次元培養法が知られている。三次元培養による細胞の製造工程においては、工程管理の容易性の観点から、細胞の品質をスフェアの状態のまま非破壊且つ簡便に評価する技術が求められる。

## 【0007】

50

スフェアの観察手法として従来のフローサイトメトリーを用いた場合、フローセルを流れるスフェアを1つずつ観察することになり、大量のスフェアの全数観測には膨大な処理時間を要する。スフェアが流れるフローセルと、スフェアのホログラムを取得する撮像装置を備えたシステムにおいて、処理時間を短縮するためには、撮像装置の撮像視野内に複数のスフェアを収めて撮像することが考えられる。しかしながら、撮像視野内に含まれる複数のスフェアは、その一部が互いに重なり合った状態で撮像されることが想定される。このような画像から個々のスフェアの状態を適切に評価するためには、互いに重なり合った状態の複数のスフェアを含む画像から、個々のスフェアの領域を特定する手法が必要となる。また、撮像装置の光軸方向における断面の画像が、スフェアの状態評価に適しているのかについても検討する必要がある。

10

**【0008】**

開示の技術は、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を適切に実施することを可能とする画像処理装置、評価システム、画像処理プログラム及び画像処理方法を提供することを目的とする。

**【課題を解決するための手段】****【0009】**

開示の技術に係る画像処理装置は、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得する取得部と、ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、ホログラムから生成する生成部と、位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、複数の粒状体の各々に対応する、光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定する特定部と、複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する抽出部と、を含む。

20

**【0010】**

開示の技術に係る画像処理装置によれば、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を適切に実施することが可能となる。

**【0011】**

特定部は、位相差画像の少なくとも一部を加算平均した加算平均画像を平均化画像として生成する加算平均画像生成部と、加算平均画像における粒状体の外縁に対応する輪郭線からの距離が、周囲の他の点よりも長くなる各点を中心とし、輪郭線に内接する複数の内接円を導出する内接円導出部と、内接円の各々について膨張処理を施す膨張処理部と、を含んでいてもよい。これにより、光軸方向と交差する平面の方向における粒状体の延在領域を適切に特定することが可能となる。

30

**【0012】**

抽出部は、光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像のうち、画素間の位相差量のばらつきが最大となるものを、粒状体の光軸方向の中心位置における位相差画像として抽出してもよい。これにより、粒状体に焦点を合わせた位相差画像を抽出することができる。

**【0013】**

粒状体は、複数の細胞の凝集体であってもよい。

**【0014】**

開示の技術に係る評価システムは、複数の粒状体を撮像視野内に収めたホログラムを撮像する撮像装置と、ホログラムに対する画像処理を行う画像処理装置と、画像処理装置によって得られた画像に基づいて、複数の粒状体の各々について評価結果を出力する評価装置と、を含む。画像処理装置は、ホログラムを取得する取得部と、ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、ホログラムから生成する生成部と、位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、複数の粒状体の各々に対応する、光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定する特定部と、複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する抽出部と、を含む。評価装置は、抽出部によって抽出された位相差画像を用いて評価結果を導出する。

40

50

## 【 0 0 1 5 】

開示の技術に係る評価システムによれば、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を自動、かつ適切に実施することが可能となる。

## 【 0 0 1 6 】

開示の技術に係る評価システムは、複数の粒状体が流動する流路を更に含み得る。撮像装置は、撮像視野内に流路の幅方向の全域が収まるように設置されていることが好ましい。これにより、従来のフローサイトメトリーを用いた評価手法と比較して、処理時間を大幅に短縮することが可能となる。

## 【 0 0 1 7 】

開示の技術に係る画像処理プログラムは、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得し、ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、ホログラムから生成し、位相差画像少なくとも一部を平均化した平均化画像において、複数の粒状体の各々に対応する、光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定し、複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出する処理をコンピュータに実行させるためのプログラムである。

## 【 0 0 1 8 】

開示の技術に係る画像処理プログラムによれば、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を自動、かつ適切に実施することが可能となる。

## 【 0 0 1 9 】

開示の技術に係る画像処理方法は、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを取得し、ホログラムを撮像する際の光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、ホログラムから生成し、位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像において、複数の粒状体の各々に対応する、光軸方向と交差する平面の方向における複数の画像範囲を特定し、複数の画像範囲の各々について、対応する粒状体の光軸方向の中心位置における位相差画像を抽出することを含む。

## 【 0 0 2 0 】

開示の技術に係る画像処理方法によれば、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を自動、かつ適切に実施することが可能となる。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 2 1 】

開示の技術は、一つの側面として、複数の粒状体を撮像視野内に収めて撮像したホログラムを用いた、個々の粒状体の状態評価を自動、かつ適切に実施することが可能となる、という効果を奏する。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 開示の技術の実施形態に係る評価システムの構成の一例を示す図である。

【 図 2 】 開示の技術の実施形態に係るホログラム光学系の構成の一例を示す図である。

【 図 3 】 開示の技術の実施形態に係る画像処理装置の機能的な構成を示す機能ブロック図である。

【 図 4 A 】 開示の技術の実施形態に係る複数のスフェアのホログラムの一例を示す図である。

【 図 4 B 】 開示の技術の実施形態に係る複数のスフェアのフーリエ変換画像の一例を示す図である。

【 図 4 C 】 開示の技術の実施形態に係る複数のスフェアのアンラッピング前の位相差画像の一例を示す図である。

【 図 4 D 】 開示の技術の実施形態に係る複数のスフェアの振幅画像の一例を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 4 E】開示の技術の実施形態に係る複数のスフェアのアンラッピング後の位相差画像の一例を示す図である。

【図 5】開示の技術の実施形態に係る位相差画像の概念を示す図である。

【図 6】開示の技術の実施形態に係る光軸方向の互いに異なる位置の各々における位相差画像の一例を示す図である。

【図 7 A】開示の技術の実施形態に係る加算平均画像の一例を示す図である。

【図 7 B】開示の技術の実施形態に係る二値化処理後の画像の一例を示す図である。

【図 7 C】開示の技術の実施形態に係る輪郭線の一例を示す図である。

【図 7 D】開示の技術の実施形態に係る距離関数を画像化した図である。

【図 7 E】開示の技術の実施形態に係る輪郭線からの距離が周囲の他の点よりも長くなる複数の点の一例を示す図である。

10

【図 7 F】開示の技術の実施形態に係る複数の内接円の一例を示す図である。

【図 7 G】開示の技術の実施形態に係る膨張処理前の内接円の一例を示す図である。

【図 7 H】開示の技術の実施形態に係る膨張処理後の画像の一例を示す図である。

【図 8】左のグラフは、スフェアの位相差画像における平面方向の位置と位相差量との関係の一例を示すグラフであり、右のグラフは、スフェアの位相差画像における位相差量のヒストグラムの一例である。

【図 9】スフェアの位相差画像における焦点位置と位相差量のばらつきとの関係の一例を示したグラフである。

【図 10】開示の技術の実施形態に係る画像処理装置のハードウェア構成の一例である。

20

【図 11】開示の技術の実施形態に係る画像処理の流れの一例を示すフローチャートである。

【図 12】開示の技術の実施形態に係る評価装置の機能的な構成の一例を示す機能ブロック図である。

【図 13】開示の技術の実施形態に係る評価装置のハードウェア構成の一例である。

【図 14】開示の技術の実施形態に係る評価処理の流れの一例を示すフローチャートである。

【図 15】スフェアの体積と位相差量総和との相関特性の一例を示すグラフである。

【図 16】開示の技術の実施形態に係る評価装置の機能的な構成の一例を示す機能ブロック図である。

30

【図 17】開示の技術の実施形態に係る評価処理の流れの他の例を示すフローチャートである。

【図 18】細胞の生存率と位相差量密度との相関特性の一例を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、開示の技術の実施形態の一例を、図面を参照しつつ説明する。なお、各図面において同一または等価な構成要素および部分には同一の参照符号を付与している。

【0024】

図 1 は、開示の技術の実施形態に係る評価システム 1 の構成の一例を示す図である。評価システム 1 は、撮像装置 10、画像処理装置 20 及び評価装置 30 を含んで構成されている。

40

【0025】

撮像装置 10 は、複数の粒状体を撮像視野内に収めたホログラムを撮像する。本実施形態において、撮像装置 10 は、フローセル 200 の内部を流動する細胞の凝集体である複数のスフェア 300 のホログラムを撮像する。

【0026】

フローセル 200 は、光透過性を有する部材で構成されており、スフェア 300 が流動する流路を形成する。本実施形態において、フローセル 200 の流路断面は、四角形とされており、幅寸法 M が例えば 10 mm 程度とされ、奥行き寸法 L が例えば 3 mm 程度とされている。すなわち、フローセル 200 の流路断面の面積は、スフェア 300 のサイズ（例

50

例えば $100\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$ 程度)よりも十分に大きい。なお、フローセル200の流路断面の形状及びサイズは、上記したものに限定されず、適宜変更することが可能である。なお、以下の説明において、撮像装置10の光軸方向をz方向とし、スフェア300の流動方向をy方向とし、フローセル200の幅方向をx方向とし、z方向と直交する平面をxy平面とする。

#### 【0027】

撮像装置10は、複数のスフェア300の全数検査時には、撮像視野内にフローセル200の幅方向(x方向)の全域が収まるように設置するのが望ましい。従って、フローセル200を流動する複数のスフェア300が、撮像装置10の撮像視野内に収められる。撮像装置10は、フローセル200の内部を流動する複数のスフェア300を連続的に撮影してもよい。これにより、フローセル200の内部を順次流動する培養中の全てのスフェア300を撮像対象とすることができる。撮像装置10は、例えばCMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor)カメラであってもよい。

10

#### 【0028】

図2は、公知のデジタルホログラフィ技術を用いてスフェアのホログラムを取得するためのホログラム光学系100の構成の一例を示す図である。ホログラム光学系100は、撮像装置10を含んで構成されている。デジタルホログラフィ技術は、物体を透過または反射した物体光と、物体光に対してコヒーレントである参照光との干渉によって生じる像をイメージセンサで撮像し、撮像によって得られた画像について、光伝搬に基づく数値計算を実施することで、物体からの光波の波面を復元する技術である。デジタルホログラフィ技術によれば、物体の位相分布を定量化し、また、焦点位置を機械的に移動させることなく、物体の三次元情報を取得することができる。

20

#### 【0029】

ホログラム光学系100は、レーザ光源101、ビームスプリッタ102、108、コリメートレンズ103、110、111、対物レンズ105、結像レンズ107及び撮像装置10を含んで構成されている。撮像対象のスフェア300が流動するフローセル200は、コリメートレンズ103と対物レンズ105との間に配置される。

#### 【0030】

レーザ光源101には、例えば波長 $632.8\ \text{nm}$ のHeNeレーザを用いることが可能である。レーザ光源101から出射されたレーザ光は、ビームスプリッタ102により、2つのレーザ光に分割される。2つのレーザ光の一方は物体光とされ、他方は参照光とされる。物体光は、コリメートレンズ103によって平行光とされた後、フローセル200の内部を流動するスフェア300に照射される。スフェア300を透過した物体光による像は、対物レンズ105によって拡大される。対物レンズ105を透過した物体光は、結像レンズ107によって再び平行光とされた後、ビームスプリッタ108を介して撮像装置10の撮像面に結像される。一方、参照光は、コリメートレンズ111を介して光ファイバ109に入射し、光ファイバ109によってコリメートレンズ110の手前まで導かれる。光ファイバ109から出射した参照光は、コリメートレンズ110によって平行光とされ、ビームスプリッタ108を介して撮像装置10の撮像面に入射する。物体光と参照光との干渉によって生じるホログラムが、撮像装置10によって記録される。なお、撮像装置10の撮像面に入射する物体光と参照光の光軸方向が互いに異なったオフアキシヤル光学系が構成されていてもよい。撮像装置10によって撮像されたスフェア300のホログラムは、撮像装置10が備える図示しない画像メモリに記憶される。画像メモリに記憶されたスフェア300のホログラムは、画像処理装置20に供給される。なお、撮像装置10の光軸方向とは、撮像系の光軸の方向であり、対物レンズ105、結像レンズ107、ビームスプリッタ108及び撮像装置10の並び方向と一致する。

30

40

#### 【0031】

図3は、画像処理装置20の機能的な構成を示す機能ブロック図である。画像処理装置20は、撮像装置10によって撮像されたホログラムに対する画像処理を行う。画像処理装置20は、取得部21、位相差画像生成部22、特定部23及び抽出部27を含んで構成

50

されている。なお、位相差画像生成部 22 は、開示の技術における生成部の一例である。特定部 23 は、加算平均画像生成部 24、内接円導出部 25 及び膨張処理部 26 を含んで構成されている。

【0032】

取得部 21 は、撮像装置 10 によって撮像された、複数のスフェアを撮像視野内に収めたホログラムを取得する。

【0033】

位相差画像生成部 22 は、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) の互いに異なる位置 z の各々における位相差画像を、取得部 21 によって取得したホログラムから生成する。なお、位相差画像の詳細については後述する。位相差画像生成部 22 は、例えば、以下の各処理を実施することにより位相差画像を生成する。

10

【0034】

はじめに、位相差画像生成部 22 は、撮像装置 10 によって取得された図 4A に例示する複数のスフェアのホログラムを、二次元フーリエ変換する。図 4B は、この処理によって得られるスフェアのフーリエ変換画像の一例である。図 4B には、直接光、物体光、共役光に基づく像が示されている。

【0035】

次に位相差画像生成部 22 は、フーリエ変換画像における直接光に対する物体光のずれ量を特定することで物体光の位置を特定し、周波数フィルタリング処理により、物体光のみの複素振幅成分を抜き出す。

20

【0036】

次に、位相差画像生成部 22 は、例えば、角スペクトル法を適用して任意の空間位置のスフェアの位相を示す画像を復元する。具体的には、位相差画像生成部 22 は、撮像装置 10 のイメージセンサ面で捉えた波面  $u(x, y; 0)$  のフーリエ変換画像の角スペクトル  $U(f_x, f_y; 0)$  を求める。次に、位相差画像生成部 22 は、下記の (1) 式に示すように、角スペクトル  $U(f_x, f_y; 0)$  に伝達関数  $H(f_x, f_y; z)$  を乗算することで、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) の任意の位置 z における波面を再生する。ここで、伝達関数  $H(f_x, f_y; z)$  は、周波数応答関数 (インパルス応答関数 (グリーン関数) のフーリエ変換) である。

【0037】

30

【数 1】

$$U(f_x, f_y; z) = U(f_x, f_y; 0)H(f_x, f_y; z), \quad H = e^{z \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}} \quad \dots (1)$$

【0038】

次に、位相差画像生成部 22 は、下記の (2) 式に示すように、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) の位置 z における波面  $U(f_x, f_y; z)$  について逆フーリエ変換を実施することで、位置 z における解  $u(x, y; z)$  を導出する。

【0039】

40

【数 2】

$$\begin{aligned} u(x, y; z) &= F^{-1}[U(f_x, f_y; z)] \\ &= F^{-1}[U(f_x, f_y; 0)H(f_x, f_y; z)] \quad \dots (2) \\ &= F^{-1}[F[u(x, y; 0)]H(f_x, f_y; z)] \end{aligned}$$

【0040】

50

次に、位相差画像生成部 22 は、下記の (3) 式に示すように、 $u(x, y; z)$  についての位相  $\phi$  を導出することで位相差画像を生成する。図 4 C は、上記の各処理によって得られるスフェアのアンラッピング前の位相差画像の一例である。

【0041】

【数 3】

$$\phi = \arctan\left(\frac{\text{Im}(u)}{\text{Re}(u)}\right) \quad \dots (3)$$

10

【0042】

なお、位相差画像生成部 22 は、下記の (4) 式に示すように、 $u(x, y; z)$  についての振幅  $a$  を導出することで、光軸方向の互いに異なる位置  $z$  の各々における振幅画像を生成してもよい。図 4 D は、複数のスフェアの振幅画像の一例である。

【0043】

【数 4】

$$a = \sqrt{(\text{Re}(u))^2 + (\text{Im}(u))^2} \quad \dots (4)$$

【0044】

図 4 C に示すアンラッピング前のスフェアの位相は、 $0 \sim 2\pi$  の値に畳みこまれている。そこで、例えば、Unweighted Least Squares (重みなし最小 2 乗法) または Flynn's Algorithm (フリンのアルゴリズム) などの位相接続 (アンラッピング) 手法を適用して 2 $\pi$  以上の部分も接合していくことで、図 4 E に例示するようなスフェアの最終的な位相差画像を得ることができる。なお、アンラッピングの手法は数多く提案されており、位相不整合を生じない適切なものを適宜選択すればよい。

20

【0045】

位相差画像生成部 22 は、上記の各処理を実施することにより、撮像装置 10 の光軸方向 ( $z$  方向) の互いに異なる位置  $z$  の各々における位相差画像を生成する。撮像装置 10 の光軸方向 ( $z$  方向) の位置  $z$  の刻み幅は、例えば、 $1 \mu\text{m}$  程度であってもよい。

30

【0046】

以下において、位相差画像について説明する。図 5 は、位相差画像  $I_p$  の概念を示す図である。図 5 の下段は、位相差画像  $I_p$  の各画素  $k$  における位相差量を三次元表示したものである。図 5 の上段は、位相差画像  $I_p$  の各画素  $k$  における位相差量を平面上にグレースケールで示したものである。

【0047】

ここで、位相差画像  $I_p$  における位相差量  $\theta_k$  は、位相差画像  $I_p$  の同一焦点面内に存在するバックグラウンド (スフェアの存在しない領域) の位相を  $\theta_B$  とし、スフェアの存在する領域の位相を  $\theta_S$  としたとき、下記の (5) 式によって表わされる。また、本明細書中における「位相」という用語は、光を電磁波とみなした場合の電場振幅の位相であり、より一般的な意味で使用される。

40

【0048】

【数 5】

$$\theta = \theta_S - \theta_B \quad \dots (5)$$

【0049】

また、位相差画像  $I_p$  の各画素  $k$  における位相差量  $\theta_k$  は、下記 (6) 式によって表わすことができる。但し、 $n_k$  は位相差画像  $I_p$  の各画素  $k$  に対応する部位におけるスフェアの屈折率であり、 $d_k$  は位相差画像  $I_p$  の各画素  $k$  に対応する部位におけるスフェアの厚

50

さであり、 $\lambda$  はホログラム光学系における物体光の波長である。

【 0 0 5 0 】

【 数 6 】

$$\theta_k = 2\pi \frac{n_k \cdot d_k}{\lambda} \dots (6)$$

【 0 0 5 1 】

スフェアの位相差画像は、スフェアを透過した物体光の光路長分布を示した画像である。スフェア内における光路長は、スフェアの屈折率とスフェアの厚さの積に相当することから、スフェアの位相差画像は、(6)式にも示されているように、スフェアの屈折率及び厚さ(形状)の情報を含んでいる。

10

【 0 0 5 2 】

図1に示すように、フローセル200の内部を流動する複数のスフェア300の配列はランダムであるため、位相差画像生成部22によって生成される、撮像装置10の光軸方向(z方向)の位置z毎の位相差画像において、複数のスフェアの少なくとも一部が、撮像装置10の光軸方向(z方向)と交差(直交)する平面(xy平面)の方向において部分的に重なった状態にあることが想定される。位相差画像を、個々のスフェアの評価に用いるためには、部分的に重なった状態の複数のスフェアを切り分けて、それぞれを別個のスフェアとして認識する必要がある。そこで、特定部23は、xy平面の方向において、他のスフェアと重なった状態のスフェアを含む複数のスフェアを捉えた位相差画像において、個々のスフェアが延在するxy平面における範囲(領域)を特定する。

20

【 0 0 5 3 】

具体的には、特定部23は、撮像装置10の光軸方向(z方向)の位置z毎の位相差画像の少なくとも一部を平均化した平均化画像を生成し、この平均化画像において、複数のスフェアの各々に対応する、xy平面の方向における複数の画像範囲を特定する。以下、特定部23の機能について、更に詳細に説明する。図3に示すように、特定部23は、加算平均画像生成部24、内接円導出部25及び膨張処理部26を含んで構成されている。

【 0 0 5 4 】

加算平均画像生成部24は、撮像装置10の光軸方向(z方向)の互いに異なる位置zの位相差画像の各々を加算平均(相加平均)した加算平均画像を上記の平均化画像として生成する。ここで、図6は、位相差画像生成部22によって生成された、撮像装置10の光軸方向(z方向)の互いに異なる位置zの各々における位相差画像の一例を示す図である。図6に示す例において、z=0となる位置は、撮像装置10の光軸方向(z方向)におけるスフェアの中心位置に対応する。なお、図6に示す例において、撮像装置10の光軸方向(z方向)の位置zを-5μmから5μmまで1μmステップで変化させた位相差画像が例示されているが、位相差画像生成部22によって生成される位相差画像における位置zの刻み幅及び位置zの範囲は、この例に限定されるものではない。

30

【 0 0 5 5 】

加算平均画像生成部24は、図6に例示される撮像装置10の光軸方向(z方向)の互いに異なる位置zの位相差画像の各々を加算平均した加算平均画像を生成する。図6に示すように、撮像装置10の光軸方向(z方向)の位置zに応じて各スフェアの外縁の鮮明度が異なる。このため、特定部23においてスフェアの領域を特定するあたり、撮像装置10の光軸方向(z方向)の特定の位置zにおける1枚の位相差画像のみを用いた場合には、スフェアの領域の特定の精度が低下するおそれがある。特定部23においてスフェアの領域を特定するあたり、撮像装置10の光軸方向(z方向)の互いに異なる位置zの位相差画像の各々を加算平均した加算平均画像を用いることで、スフェアの領域の特定の精度を高めることが可能となる。なお、加算平均画像生成部24は、位相差画像生成部22によって生成された、撮像装置10の光軸方向(z方向)の位置zが互いに異なる複数の位相差画像の一部について加算平均画像を生成してもよいし、全部を用いて加算平均画像を

40

50

生成してもよい。

【 0 0 5 6 】

内接円導出部 2 5 は、加算平均画像において、スフェアの外縁に対応する輪郭線からの距離が周囲の他の点よりも長くなる各点を中心とし、上記の輪郭線に内接する複数の内接円を導出する。具体的には、内接円導出部 2 5 は、例えば、以下の各処理を実施することにより内接円を導出する。

【 0 0 5 7 】

はじめに、内接円導出部 2 5 は、加算平均画像生成部 2 4 によって生成された図 7 A に例示する加算平均画像について二値化処理を実施する。図 7 B は、二値化処理後の画像の一例を示す図である。

【 0 0 5 8 】

次に、内接円導出部 2 5 は、二値化処理後の画像からスフェアの外縁に対応する輪郭線を抽出する。図 7 C は、二値化処理後の画像から抽出された輪郭線 4 0 0 の一例を示す図である。

【 0 0 5 9 】

次に、内接円導出部 2 5 は、距離関数  $(x, y)$  を用いて、抽出された輪郭線 4 0 0 からの距離が、周囲の他の点よりも長くなる複数の点を抽出する。距離関数  $(x, y)$  は、画像内の任意の画素の座標  $(x, y)$  からの距離が最も短い位置にある輪郭線 4 0 0 上の点と、座標  $(x, y)$  との距離を、輪郭線 4 0 0 の内側領域の各画素について導出したものである。因みに、距離関数  $(x, y) = 0$  となる点は、輪郭線上の点となる。図 7 D は、距離関数  $(x, y)$  を画像化した図である。図 7 E は、距離関数  $(x, y)$  に基づいて抽出された、輪郭線 4 0 0 からの距離が周囲の他の点よりも長くなる複数の点 C の一例を示す図である。

【 0 0 6 0 】

次に、内接円導出部 2 5 は、抽出した複数の点 C の各々を中心とし、輪郭線 4 0 0 に内接する複数の内接円を導出する。図 7 F は、導出された複数の内接円 4 0 1 の一例を示す図である。

【 0 0 6 1 】

膨張処理部 2 6 は、内接円導出部 2 5 によって導出された内接円 4 0 1 の各々について膨張処理を施す。具体的には、膨張処理部 2 6 は、例えば、以下の処理を実施する。はじめに、膨張処理部 2 6 は、図 7 G に示すように、膨張処理前の内接円 4 0 1 の各々を塗りつぶす。続いて、膨張処理部 2 6 は、既に塗りつぶされた画素に隣接する 8 画素のうち、塗りつぶされていない画素が存在する場合、塗りつぶされていない画素を塗りつぶす。膨張処理部 2 6 がこの処理を繰り返すことにより塗りつぶされた領域が拡大する。膨張処理部 2 6 は、上記の膨張処理を、内接円導出部 2 5 によって導出された全ての内接円 4 0 1 に対して同時並行で実施する。膨張処理部 2 6 は、互いに異なる内接円 4 0 1 に由来する塗りつぶし領域同士が衝突した場合、及び塗りつぶし領域が輪郭線 4 0 0 に到達した場合、当該画素における膨張処理を終了する。図 7 H は、膨張処理後の画像の一例を示す図である。膨張処理後の塗りつぶし領域の各々は、複数のスフェアの各々に対応する画像範囲である。

【 0 0 6 2 】

加算平均画像生成部 2 4、内接円導出部 2 5 及び膨張処理部 2 6 を含んで構成される特定部 2 3 が、上記の各処理を行うことで、 $x y$  平面の方向において他のスフェアと重なった状態のスフェアを含む複数のスフェアを捉えた位相差画像において、個々のスフェアが延在する  $x y$  平面における範囲（領域）が特定される。

【 0 0 6 3 】

抽出部 2 7（図 1 参照）は、特定部 2 3 において特定された、スフェアの各々に対応する画像範囲の各々について、図 6 に例示する撮像装置 1 0 の光軸方向（ $z$  方向）の位置  $z$  毎の位相差画像の中から、対応するスフェアの光軸方向（ $z$  方向）の中心位置における位相差画像を抽出する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 4 】

スフェアに対して焦点が合っていない位相差画像からは、回折による広がりの影響によりスフェアの実態に合致した正確な情報が得られない。位相差画像を用いて細胞の評価を行う場合には、評価対象のスフェアに焦点を合わせた位相差画像を用いることが好ましい。ここで、「スフェアに焦点を合わせる」とは、球形状のスフェアの中心付近でスライスした位相差画像を得ることを意味する。スフェアに焦点が合った位相差画像を用いてスフェアの評価を行うことで、より正確な評価を行うことができる。

## 【 0 0 6 5 】

以下に、抽出部 27 が、スフェアの光軸方向 ( z 方向 ) の中心位置における位相差画像を抽出する処理の詳細について説明する。

10

## 【 0 0 6 6 】

図 8 の左のグラフは、スフェアの位相差画像における平面方向 ( x 方向または y 方向 ) の位置と位相差量との関係の一例を示すグラフであり、実線がスフェアに焦点が合っている状態に対応し、点線がスフェアに焦点が合っていない状態に対応する。スフェアに焦点が合っている場合、位相差画像における特定の位置に急峻なピークが現れる。一方、スフェアに焦点が合っていない場合、焦点が合っている場合と比較してピークが低く且つなだらかになる。

## 【 0 0 6 7 】

図 8 の右のグラフは、スフェアの位相差画像における位相差量のヒストグラムの一例であり、実線がスフェアに焦点が合っている状態に対応し、点線がスフェアに焦点が合っていない状態に対応する。スフェアに焦点が合っている場合、カーブの幅  $w$  ( 位相差量のばらつき ) は、相対的に大きくなり、スフェアに焦点が合っていない場合、カーブの幅  $w$  ( 位相差量のばらつき ) は、相対的に小さくなる。

20

## 【 0 0 6 8 】

従って、撮像装置 10 の光軸方向 ( z 方向 ) の互いに異なる位置  $z$  毎のスフェアの位相差画像の各々について、位相差量のヒストグラムにおけるカーブの幅  $w$  ( 位相差量のばらつき ) を求め、求めた幅  $w$  のうち、最大の幅  $w$  を有する位相差画像を、スフェアに焦点が合った位相差画像として抽出することで焦点合わせを実現できる。最大の幅  $w$  を有する位相差画像、すなわち、位相差量のばらつきが最大となる位相差画像は、スフェアの光軸方向 ( z 方向 ) の中心位置における位相差画像に対応する。

30

## 【 0 0 6 9 】

抽出部 27 は、特定部 23 において特定された、スフェアの各々に対応する画像範囲 ( スフェアの  $x$   $y$  平面における範囲 ) の各々について、位相差量のばらつきを導出する処理を、撮像装置 10 の光軸方向 ( z 方向 ) の位置  $z$  毎の位相差画像の各々について行う。抽出部 27 は、例えば、特定された画像範囲における位相差量の最大値と最小値との差分を、当該画像範囲における位相差量のばらつきとして導出してよい。また、特定された画像範囲における位相差量の標準偏差を、当該画像範囲における位相差量のばらつきとして導出してよい。抽出部 27 は、特定された画像範囲の各々について、位相差量のばらつきが最大となる位置  $z$  の画像を抽出する。

## 【 0 0 7 0 】

図 9 は、スフェアの位相差画像における焦点位置 ( スライス位置 ) と位相差量のばらつきとの関係の一例を示したグラフである。図 9 には、焦点位置が、  $-400 \mu\text{m}$ 、  $-200 \mu\text{m}$ 、  $0 \mu\text{m}$ 、  $+200 \mu\text{m}$ 、及び  $+400 \mu\text{m}$  に対応するスフェアの位相差画像が、グラフとともに例示されている。なお、図 9 では、位相差量のばらつきが最大となる焦点位置を  $0 \mu\text{m}$  としている。位相差量のばらつきが最大となる焦点位置  $0 \mu\text{m}$  に対応する位相差画像が、焦点が合った位相差画像として抽出される。位相差量のばらつきが最大となる焦点位置  $0 \mu\text{m}$  に対応する位相差画像において、スフェアの輪郭が最も鮮明となる。

40

## 【 0 0 7 1 】

図 10 は、画像処理装置 20 のハードウェア構成の一例である。画像処理装置 20 は、CPU ( Central Processing Unit ) 501、一時記憶領域としての主記憶装置 502、不

50

揮発性の補助記憶装置 503、撮像装置 10 及び評価装置 30 を含む他の装置との間で通信を行うための通信インターフェース 504 を含んで構成されている。CPU 501、主記憶装置 502、補助記憶装置 503 及び通信インターフェース 504 は、それぞれ、バス 505 に接続されている。

【0072】

補助記憶装置 503 には、CPU 501 を、取得部 21、位相差画像生成部 22、特定部 23 及び抽出部 27 として機能させるための画像処理プログラム 506 が格納されている。CPU 501 は、通信インターフェース 504 を介して供給される外部からの指示に基づいて、補助記憶装置 503 から画像処理プログラム 506 を読み出して主記憶装置 502 に展開し、画像処理プログラム 506 に記述された画像処理を順次実行する。

10

【0073】

図 11 は、画像処理プログラム 506 に記述された画像処理の流れの一例を示すフローチャートである。

【0074】

ステップ S1 において、CPU 501 は、取得部 21 として機能し、撮像装置 10 によって撮像された、複数のスフェアを撮像視野内に収めたホログラムを取得する。

【0075】

ステップ S2 において、CPU 501 は、位相差画像生成部 22 として機能し、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) の互いに異なる位置 z の各々における位相差画像をホログラムから生成する。

20

【0076】

ステップ S3 において、CPU 501 は、特定部 23 (加算平均画像生成部 24) として機能し、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) の互いに異なる位置 z の位相差画像の各々を加算平均した加算平均画像 (図 6 参照) を生成する。

【0077】

ステップ S4 において、CPU 501 は、特定部 23 (内接円導出部 25) として機能し、加算平均画像について二値化処理を実施する (図 7 B 参照)。

【0078】

ステップ S5 において、CPU 501 は、特定部 23 (内接円導出部 25) として機能し、二値化処理後の画像からスフェアの外縁に対応する輪郭線 400 を抽出する (図 7 C 参照)。

30

【0079】

ステップ S6 において、CPU 501 は、特定部 23 (内接円導出部 25) として機能し、距離関数 ( $x, y$ ) を用いて、抽出された輪郭線 400 からの距離が、周囲の他の点よりも長くなる複数の点 C を特定する (図 7 E 参照)。

【0080】

ステップ S7 において、CPU 501 は、特定部 23 (内接円導出部 25) として機能し、抽出した複数の点 C の各々を中心とし、輪郭線 400 に内接する複数の内接円 401 を導出する (図 7 F 参照)。

【0081】

ステップ S8 において、CPU 501 は、特定部 23 (膨張処理部 26) として機能し、内接円 401 の各々について膨張処理を施す。以上の各処理により、複数のスフェアの各々に対応する、撮像装置 10 の光軸方向 (z 方向) と交差する平面 (xy 平面) の方向における複数の画像範囲が特定される。すなわち、他のスフェアと重なり部を有して存在する複数のスフェアの各々の xy 平面の方向における領域が特定される。

40

【0082】

ステップ S9 において、CPU 501 は、抽出部 27 として機能し、ステップ S8 において特定したスフェアの各々に対応する画像範囲の各々について、位相差量のばらつきを導出する。CPU 501 は、例えば、特定された画像範囲における位相差量の最大値と最小値との差分を、当該画像範囲における位相差量のばらつきとして導出してよい。また、

50

C P U 5 0 1 は、特定された画像範囲における位相差量の標準偏差を、当該画像範囲における位相差量のばらつきとして導出してもよい。C P U 5 0 1 は、ステップ S 2 において生成した、撮像装置 1 0 の光軸方向（z 方向）の位置 z 毎の位相差画像の各々について位相差量のばらつきを導出する上記の処理を行う。

【 0 0 8 3 】

ステップ S 1 0 において、C P U 5 0 1 は、抽出部 2 7 として機能し、ステップ S 8 において特定したスフェアの各々に対応する画像範囲の各々について、位相差量のばらつきが最大となる光軸方向の位置 z の画像を抽出する。

【 0 0 8 4 】

評価装置 3 0 は、画像処理装置 2 0 の抽出部 2 7 によって抽出された位相差画像を用いて、スフェアの評価を行い、評価結果を出力する。

10

【 0 0 8 5 】

図 1 2 は、評価装置 3 0 の機能的な構成の一例を示す機能ブロック図である。評価装置 3 0 は、取得部 3 1、形状指標値導出部 3 2、位相差量総和導出部 3 3 及び判定部 3 4 を含んで構成されている。

【 0 0 8 6 】

取得部 3 1 は、画像処理装置 2 0 の抽出部 2 7 によって抽出された位相差画像を取得する。すなわち、取得部 3 1 は、複数のスフェアの各々について、撮像装置 1 0 の光軸方向（z 方向）の中心位置における位相差画像を取得する。

【 0 0 8 7 】

形状指標値導出部 3 2 は、取得部 3 1 によって取得された位相差画像に含まれるスフェアの形状指標値を導出する。スフェアの形状指標値として、例えば、スフェアの体積、断面積、粒径及び周の長さなどを用いることができる。スフェアの粒径及び周の長さは、スフェアの光軸方向の中心位置における位相差画像から直接的に求めることが可能である。スフェアの断面積は、例えば、スフェアの粒径を直径とする円の断面積として導出することが可能である。スフェアの体積は、例えばスフェアの粒径を直径とする球の体積として導出することが可能である。

20

【 0 0 8 8 】

位相差量総和導出部 3 3 は、位相差画像を構成する複数の画素の各々の位相差量を積算した値である位相差量総和  $A$  を導出する。位相差量総和  $A$  は、下記の（7）式によって表わされる。但し、 $s$  は位相差画像の各画素  $k$  の面積であり、 $v_k$  は位相差画像の各画素  $k$  に対応する部位におけるスフェアの体積である。（7）式に示されるように、位相差量総和  $A$  は、スフェアの位相差画像の画素毎の位相差量  $\theta_k$  を、全ての画素  $k$  について積算したものに相当する。なお、（7）式における  $d_k$  は画素  $k$  に投影されたスフェア部分の厚みを示し、 $n_k$  はバックグラウンドである培養液とスフェア内部との屈折率差を表す。（7）式では、 $v_k = d_k \cdot s$  を用いた。ここで、（7）式により、位相差量総和  $A$  の単位は面積のスケールとなって、例えば  $[\mu\text{m}^2]$  であるが、イメージセンサ間で比較を行わない場合には単に 1 ピクセルあたりの画素毎の位相差量  $\theta_k$  の和として位相差量総和  $A$  の単位を  $[\text{pixel}]$  とし、つまり  $s = 1[\text{pixel}]$  として扱ってもよい。

30

【 0 0 8 9 】

【数 7】

$$\theta_A = \sum_{k=1}^N \theta_k \cdot s = \frac{2\pi}{\lambda} \sum_{k=1}^N n_k \cdot d_k \cdot s = \frac{2\pi}{\lambda} \sum_{k=1}^N n_k \cdot v_k \quad \dots (7)$$

40

【 0 0 9 0 】

判定部 3 4 は、位相差量総和  $A$  とスフェアの形状指標値との相関性の基準を示す基準相関トレンドラインと、判定対象のスフェアについての位相差量総和  $A$  と形状指標値との相関性とを比較し、判定対象のスフェアについての相関性の、基準相関トレンドラインか

50

らの乖離の程度に応じて当該判定対象のスフェアの状態を判定する。なお、基準相関トレンドラインは、予め取得したものをを用いることができる。判定部34は、判定対象のスフェアについての相関性の、基準相関トレンドラインからの乖離の幅が閾値を超える場合、当該判定対象のスフェアに含まれる細胞の生存率、密度、均質性及び前記スフェアの外形形状の少なくとも1つについて異常ありと判定してもよい。

【0091】

図13は、評価装置30のハードウェア構成の一例である。評価装置30は、CPU601、一時記憶領域としての主記憶装置602、不揮発性の補助記憶装置603、画像処理装置20を含む他の装置との間で通信を行うための通信インターフェース604を含んで構成されている。CPU601、主記憶装置602、補助記憶装置603、通信インターフェース604は、それぞれ、バス605に接続されている。

10

【0092】

補助記憶装置603には、CPU601を、取得部31、形状指標値導出部32、位相差量総和導出部33及び判定部34として機能させるための評価プログラム606が格納されている。CPU601は、通信インターフェース604を介して供給される外部からの指示に基づいて、補助記憶装置603から評価プログラム606を読み出して主記憶装置602に展開し、評価プログラム606に記述された評価処理を順次実行する。なお、本実施形態においては、評価装置30及び画像処理装置20を、別々のコンピュータによって構成する場合を例示しているが、評価装置30及び画像処理装置20を共通のコンピュータによって構成することも可能である。

20

【0093】

図14は、評価プログラム606に記述された評価処理の流れの一例を示すフローチャートである。

【0094】

ステップS11において、CPU601は、取得部31として機能し、画像処理装置20の抽出部27によって抽出された位相差画像を取得する。

【0095】

ステップS12において、CPU601は、形状指標値導出部32として機能し、ステップS11において取得した位相差画像に含まれるスフェアの形状指標値を導出する。スフェアの形状指標値として、例えば、スフェアの体積、断面積、粒径及び周の長さなどを用いることができる。

30

【0096】

ステップS13において、CPU601は、位相差量総和導出部33として機能し、ステップS11において取得した位相差画像について位相差量総和  $A$  を導出する。

【0097】

ステップS14において、CPU601は、判定部34として機能し、位相差量総和  $A$  とスフェアの形状指標値との相関性の基準を示す基準相関トレンドラインと、判定対象のスフェアについての位相差量総和  $A$  と形状指標値との相関性とを比較し、判定対象のスフェアについての相関性の、基準相関トレンドラインからの乖離の程度に応じて当該判定対象のスフェアの状態を判定し、判定結果を出力する。なお、基準相関トレンドラインは、補助記憶装置603に予め記憶したものをを用いることができる。判定部34は、判定対象のスフェアについての相関性の、基準相関トレンドラインからの乖離の幅が閾値を超える場合、当該判定対象のスフェアに含まれる細胞の生存率、密度、均質性及び前記スフェアの外形形状の少なくとも1つについて異常ありと判定してもよい。

40

【0098】

図15は、スフェアの体積と位相差量総和  $A$  との相関特性の一例を示すグラフである。図15に示すように、位相差量総和  $A$  とスフェアの体積とは、比例関係であることが確認された。図15には、スフェアの体積と位相差量総和  $A$  との間の相関性の基準を示す基準相関トレンドライン  $L_S$  が、プロットと共に示されている。図15に示す各プロットから導出した回帰線を、基準相関トレンドライン  $L_S$  として適用した。

50

## 【 0 0 9 9 】

図 1 5 には、基準相関トレンドライン  $L_S$  上に存在するプロット a 1 及び a 2 に対応するスフェアの位相差画像、及び基準相関トレンドライン  $L_S$  から乖離した位置に存在するプロット a 3、a 4、a 5 に対応するスフェアの位相差画像が示されている。基準相関トレンドライン  $L_S$  上に存在するプロット a 1 及び a 2 に対応するスフェアについては、スフェアの全体に亘って輝度が均一な位相差画像が得られた。このことは、スフェアを構成する複数の細胞が均質であること、及びスフェア内における細胞の密度が均一であること等を示している。一方、基準相関トレンドライン  $L_S$  から乖離した位置に存在するプロット a 3 及び a 4 に対応するスフェアについては、中心部の輝度が他の部位と比較して低下している位相差画像が得られた。このことは、スフェアを構成する複数の細胞が不均質であること、及びスフェア内における細胞の密度が不均一であること等を示している。また、基準相関トレンドライン  $L_S$  から乖離した位置に存在するプロット a 5 に対応するスフェアについては、スフェアの輪郭線の凹凸が顕著な位相差画像が得られた。このことは、スフェアを構成する細胞に異常が生じていること等を示している。

10

## 【 0 1 0 0 】

以上の結果から、位相差量総和  $A$  と、スフェアの形状指標値の一例である体積との相関性を用いてスフェアの状態を判定することが可能であるといえる。また、位相差量総和  $A$  とスフェアの体積との相関性を示す基準相関トレンドライン  $L_S$  と、判定対象のスフェアについての位相差量総和  $A$  と形状指標値との相関性とを比較し、判定対象のスフェアについての相関性の、基準相関トレンドライン  $L_S$  からの乖離の程度に応じて当該スフェアの状態を判定することが可能であるといえる。具体的には、一方の軸にスフェアの体積をとり、他方の軸に位相差量総和  $A$  をとったグラフ上にプロットした、判定対象のスフェアについてのプロットの、基準相関トレンドライン  $L_S$  からの乖離の程度に応じて、各スフェアの状態を判定することが可能であるといえる。従って、例えば、位相差量総和  $A$  の基準相関トレンドライン  $L_S$  からのマイナス幅が閾値以上であるスフェアについては、当該スフェアに含まれる複数の細胞の密度、均質性、及びスフェアの外形形状のうちの少なくとも 1 つに異常があるものと判定することができる。

20

## 【 0 1 0 1 】

なお、本実施例では、スフェアの形状指標値としてスフェアの体積を用いたが、これに代えて、スフェアの断面積、粒径または周の長さを用いることも可能である。これらいずれの形状指標値を用いる場合でも、位相差量総和  $A$  との相関性を用いてスフェアの状態を判定することが可能である。

30

## 【 0 1 0 2 】

以下に、評価装置 3 0 の他の態様について説明する。図 1 6 は、評価装置 3 0 の機能的な構成の他の例を示す機能ブロック図である。評価装置 3 0 は、取得部 3 1、位相差量密度導出部 3 5 及び判定部 3 4 を含んで構成されている。本実施形態において、評価装置 3 0 は、位相差量総和  $A$  を当該スフェアの体積で除算した位相差量密度  $D_p$  を導出し、導出した位相差量密度  $D_p$  に基づいて、当該スフェアの状態を判定する。

## 【 0 1 0 3 】

位相差量密度  $D_p$  は、下記の ( 8 ) 式によって表わされる。但し、 $V$  はスフェアの体積である。( 8 ) 式に示されるように、位相差量密度  $D_p$  は、位相差量総和  $A$  を当該スフェアの体積  $V$  で除算したものに相当する。健全な細胞は、その恒常性から内部の屈折率は、媒質の屈折率とは異なる一定の値を維持するものと考えられる。一方、死細胞は、恒常性を喪失し、内部の屈折率が媒質の屈折率と略同じになるものと考えられる。従って、位相差量密度  $D_p$  を、細胞の状態を示す指標として用いることが可能であると考えられる。例えば、判定対象のスフェアについて取得した位相差量密度  $D_p$  が、閾値以上である場合に当該スフェアの状態が良好であると判定することができ、位相差量密度  $D_p$  が、閾値未満である場合に当該スフェアの状態が異常であると判定することができる。なお、 $2 /$  は、定数として扱うことができるので、位相差量密度  $D_p$  の導出に際し、 $2 /$  の乗算を省略してもよい。ここで、スフェアの体積平均屈折率差  $N_{ave}$  を  $N_{ave} = n_k \cdot$

40

50

( $v_k / V$ ) とすると、(8)式は、 $D_p = (2 / \lambda) \times N_{ave}$  となることから、位相差密度は体積平均したスフェアの屈折率差を波長の長さで規格化したものである。本明細書において、 $V$  はスフェアの位相像の断面画像から球相当径を算出して求めた。より正確に楕円球とすることも可能である。

【数 8】

$$D_P = \frac{\theta_A}{V} = \frac{2\pi}{\lambda} \sum_{k=1}^N n_k \cdot \frac{V_k}{V} \quad \dots (8)$$

10

【0104】

本実施形態に係る評価装置 30 のハードウェア構成は、図 13 に示されたものと同様である。図 17 は、本実施形態に係る評価プログラム 606 に記述された評価処理の流れの他の例を示すフローチャートである。

【0105】

ステップ S21 において、CPU 601 は、取得部 31 として機能し、画像処理装置 20 の抽出部 27 によって抽出された位相差画像を取得する。

【0106】

ステップ S22 において、CPU 601 は、位相差量密度導出部 35 として機能し、ステップ S21 において取得した位相差画像について位相差量密度  $D_p$  を導出する。

20

【0107】

ステップ S23 において CPU 601 は、判定部 34 として機能し、予め取得しておいた細胞の生存率と位相差量密度  $D_p$  との相関性を示す相関ラインと、ステップ S22 において導出した位相差量密度  $D_p$  とに基づいて、当該スフェア内における細胞の生存率を推定し、これを判定結果として出力する。

【0108】

図 18 は、細胞の生存率と位相差量密度  $D_p$  (ロット平均値) との相関特性の一例を示すグラフである。生存率の測定手順は以下のとおりである。遠沈管に収容したスフェアを 400 G、3 分間の遠心分離処理を実施した。遠沈管の底に沈殿したスフェアを回収し、細胞解離酵素である TrypLE (登録商標) Select を用いて単一細胞に分解した。分解した細胞に対して Trypan Blue による死細胞染色処理を施した後、細胞を、市販されている一般的なセルカウンタ (Countess (登録商標)) で計数することで、染色された死細胞の個数をカウントした。死細胞のカウント数から細胞の生存率を培養ロット毎に導出した。

30

【0109】

横軸に細胞の生存率をとり、縦軸に位相差量密度  $D_p$  をとったグラフ上に、各培養ロットについてプロットを形成することで、細胞の生存率と位相差量密度  $D_p$  (ロット平均値) との相関特性を取得した。図 18 に示すように、細胞の生存率と、位相差量密度  $D_p$  とは比例関係であることが確認された。

【0110】

以上の結果より、位相差量密度  $D_p$  から細胞の生存率を推定できるといえる。位相差量密度  $D_p$  から細胞の生存率を推定することで、遠心分離処理及び染色処理等の細胞の破壊を伴う処理を行うことなく (すなわち非破壊で)、細胞の生存率を把握することができる。本実施形態に係る評価装置 30 は、細胞の生存率と位相差量密度  $D_p$  との相関性を示す相関ラインと、判定対象の培養ロットに属するスフェアについて取得した位相差量密度  $D_p$  の平均値とから推定した当該培養ロットにおける細胞の生存率を判定結果として出力する。

40

【0111】

以上のように、開示の技術の実施形態に係る評価システム 1 によれば、位相差画像生成部 22 によって生成される位相差画像において、複数のスフェアの少なくとも一部が、撮像装置 10 の光軸方向 ( $z$  方向) と交差する平面 ( $xy$  平面) の方向において部分的に重なった状態にあることが想定される。位相差画像を用いて個々のスフェアの評価を行うため

50

には、位相差画像において部分的に重なった状態の複数のスフェアを切り分けて、それぞれを別個のスフェアとして認識する必要がある。

【0112】

開示の技術の実施形態に係る画像処理装置20によれば、位相差画像生成部22が、撮像装置10の光軸方向(z方向)の互いに異なる位置の各々における位相差画像を、撮像装置10によって撮像されたホログラムから生成し、特定部23が位相差画像の各々を加算平均した加算平均画像において、複数のスフェアの各々に対応する、xy平面の方向における複数の画像範囲を特定し、抽出部27が、特定された画像範囲の各々について、対応するスフェアの光軸方向(z方向)の中心位置における位相差画像を抽出する。すなわち、特定部23により個々のスフェアが延在するxy平面における範囲(領域)が特定され、抽出部27により、各スフェアの延在範囲(領域)について、適切に焦点合わせがなされた位相差画像が抽出される。従って、画像処理装置20によれば、各スフェアの状態評価を適切に実施することが可能となる。

10

【0113】

また、開示の技術の実施形態に係る評価システム1によれば、複数のスフェアを撮像視野内に収めて撮像したホログラムに基づいて、複数のスフェアの各々についての評価を行うので、従来のフローサイトメトリーを用いた評価手法と比較して、処理時間を大幅に短縮することが可能となる。すなわち、評価システム1によれば、大量のスフェアを、非破壊且つ迅速に評価することが可能となる。

20

【0114】

なお、以上の説明では、細胞の凝集体であるスフェアの状態を評価する場合を例示したが、開示の技術は、スフェア以外の粒状体を評価する場合についても適用することが可能である。また、特定部23が、スフェアの各々に対応する画像範囲を特定する際に用いる平均化画像として加算平均画像を用いる場合を例示したが、位相差画像の少なくとも一部を相乗平均した相乗平均画像を平均化画像として用いてもよいし、位相差画像の少なくとも一部を加重平均した加重平均画像を平均化画像として用いてもよい。

【符号の説明】

【0115】

1 評価システム

10 撮像装置

20 画像処理装置

21 取得部

22 位相差画像生成部

23 特定部

24 加算平均画像生成部

25 内接円導出部

26 膨張処理部

27 抽出部

30 評価装置

31 取得部

32 形状指標値導出部

33 位相差量総和導出部

34 判定部

35 位相差量密度導出部

100 ホログラム光学系

101 レーザ光源

102 ビームスプリッタ

103 コリメートレンズ

105 対物レンズ

107 結像レンズ

30

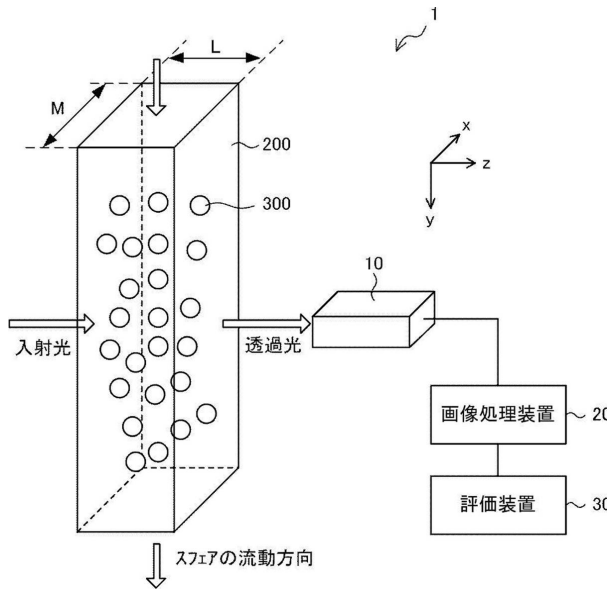
40

50

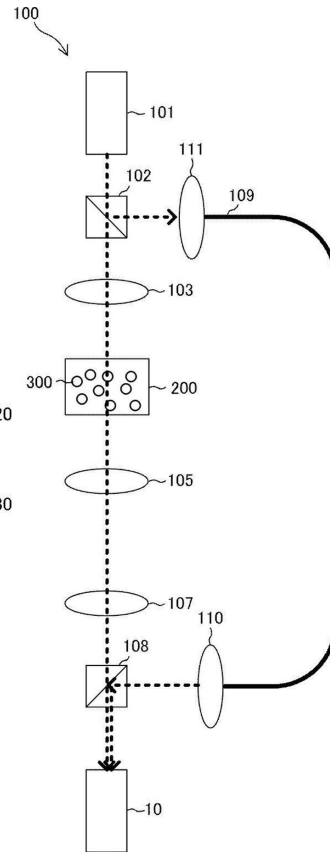
- 108 ビームスプリッタ
- 109 光ファイバ
- 110 コリメートレンズ
- 200 フローセル
- 300 スフェア
- 400 輪郭線
- 401 内接円
- 501、601 CPU
- 502、602 主記憶装置
- 503、603 補助記憶装置
- 504、604 通信インターフェース
- 505、605 バス
- 506 画像処理プログラム
- 606 評価プログラム

【図面】

【図1】



【図2】



10

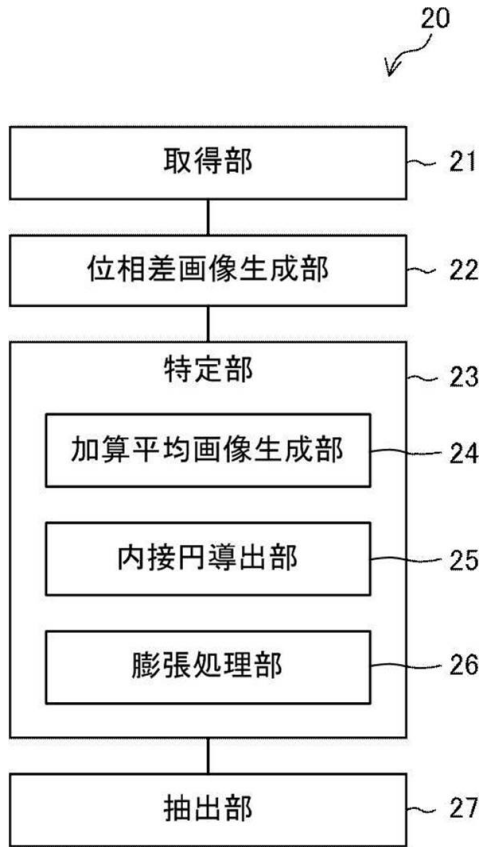
20

30

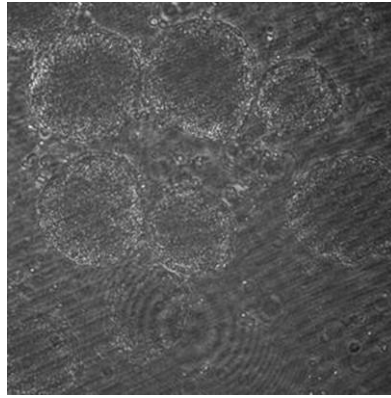
40

50

【図3】



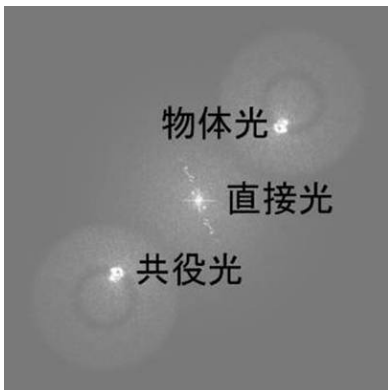
【図4A】



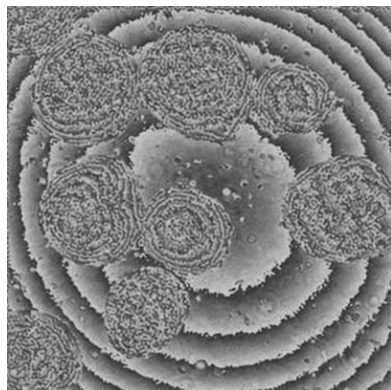
10

20

【図4B】



【図4C】

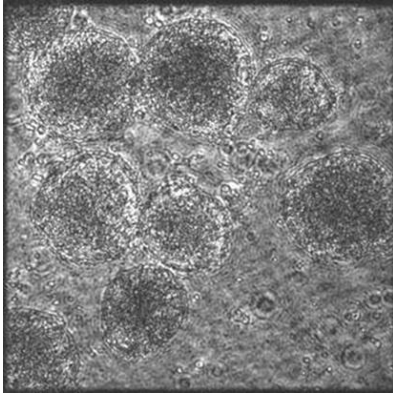


30

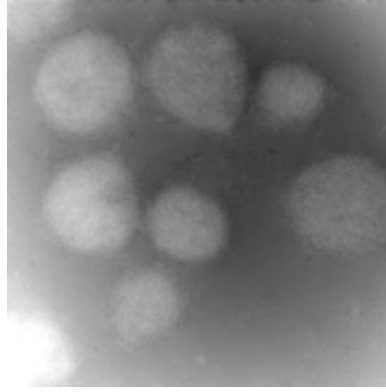
40

50

【 図 4 D 】

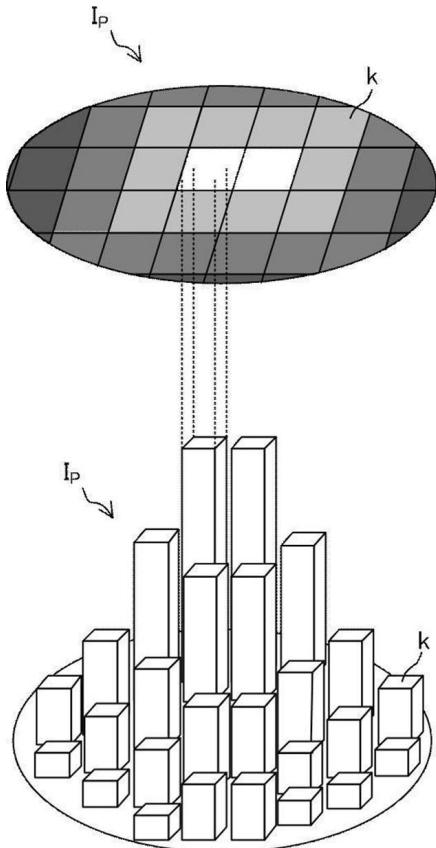


【 図 4 E 】

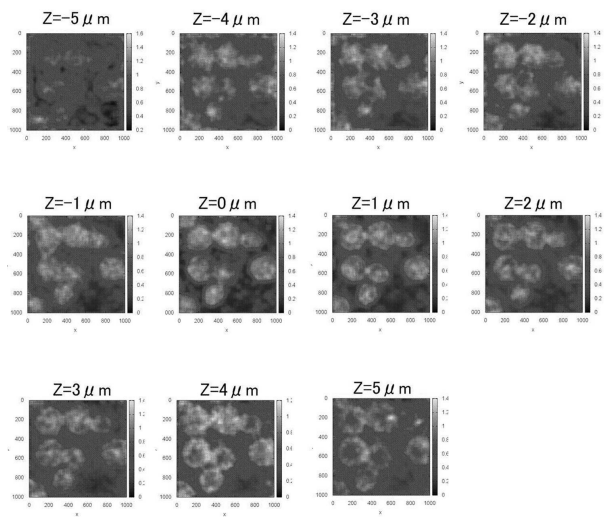


10

【 図 5 】



【 図 6 】



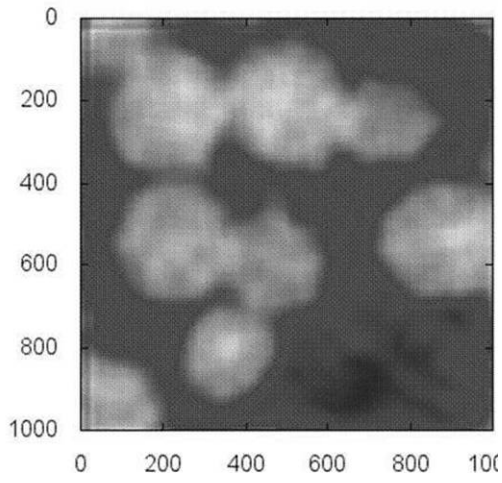
20

30

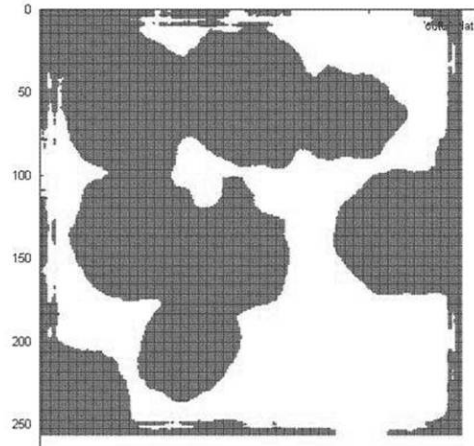
40

50

【図 7 A】

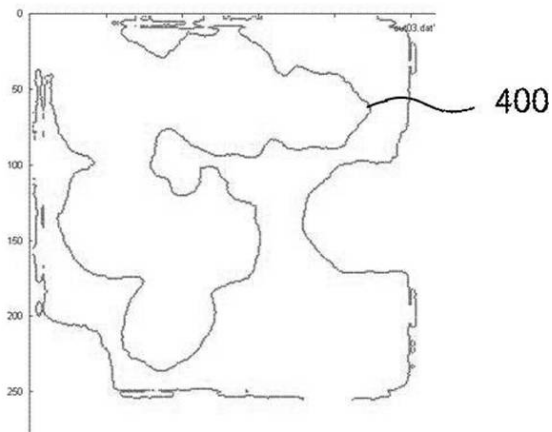


【図 7 B】

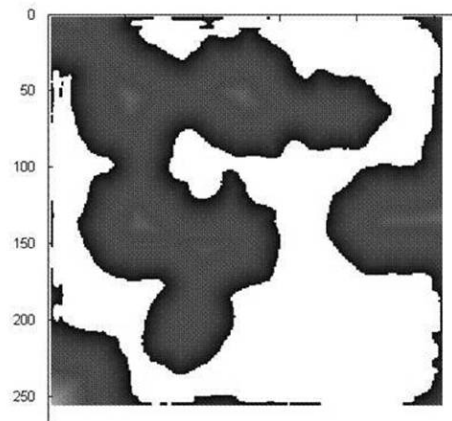


10

【図 7 C】



【図 7 D】



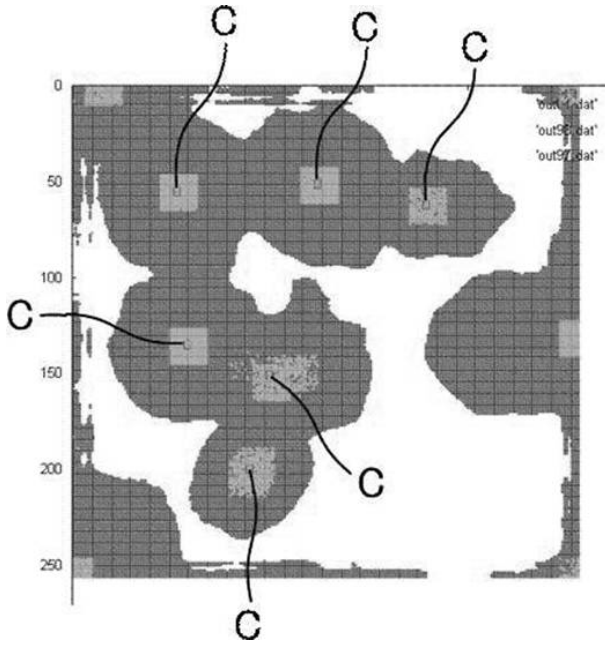
20

30

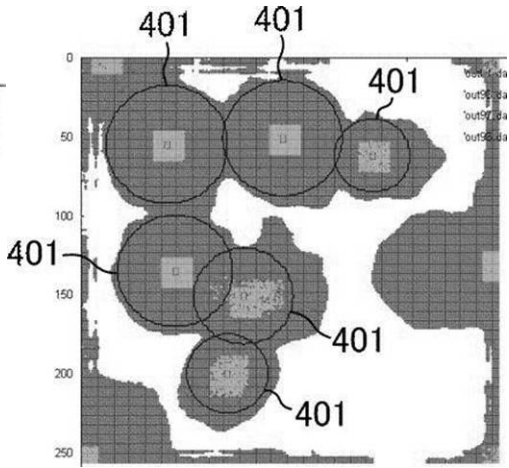
40

50

【図 7 E】

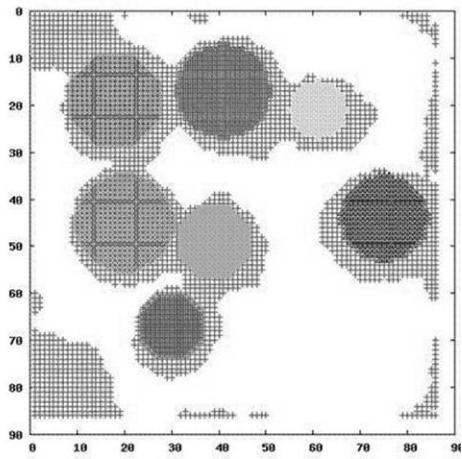


【図 7 F】

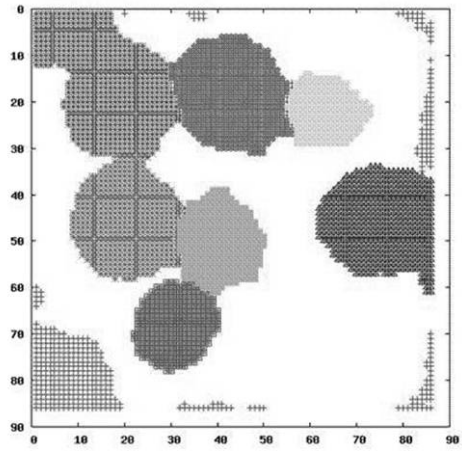


10

【図 7 G】



【図 7 H】



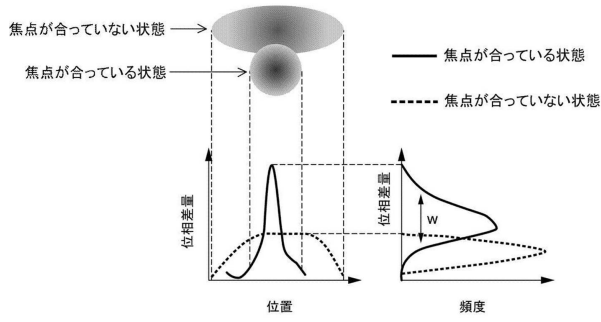
20

30

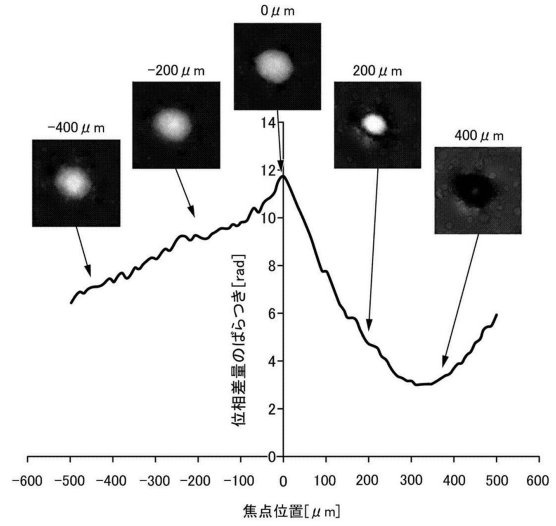
40

50

【図8】

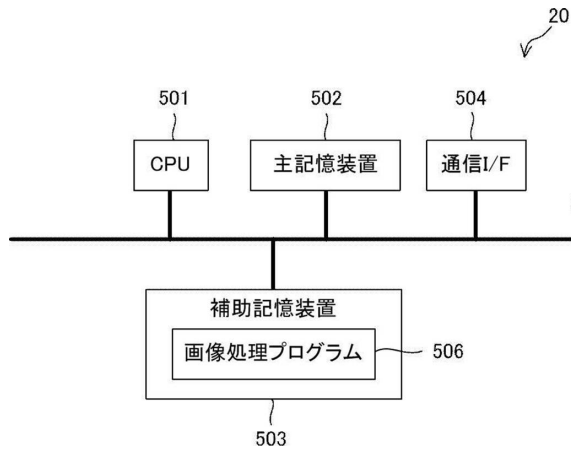


【図9】

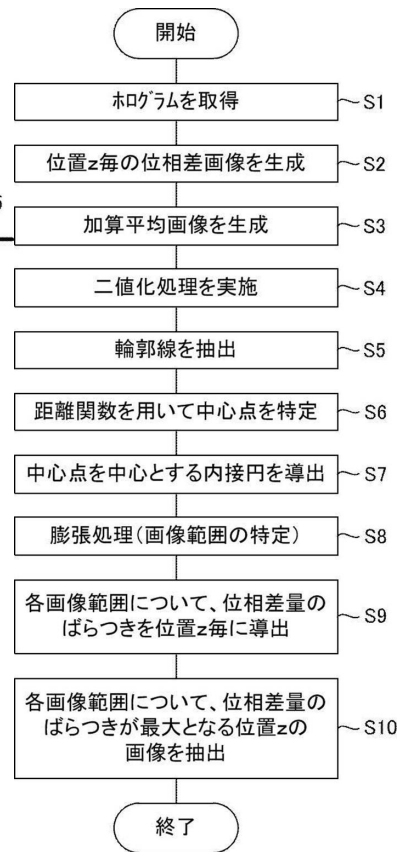


10

【図10】



【図11】



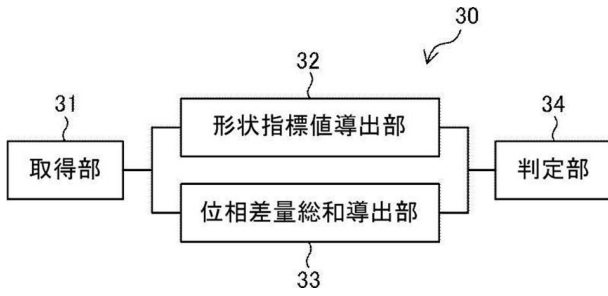
20

30

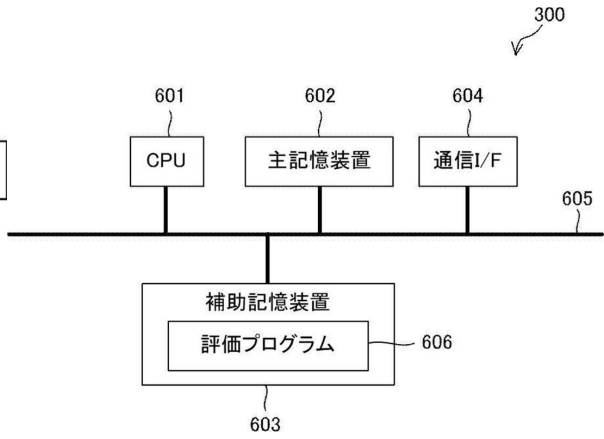
40

50

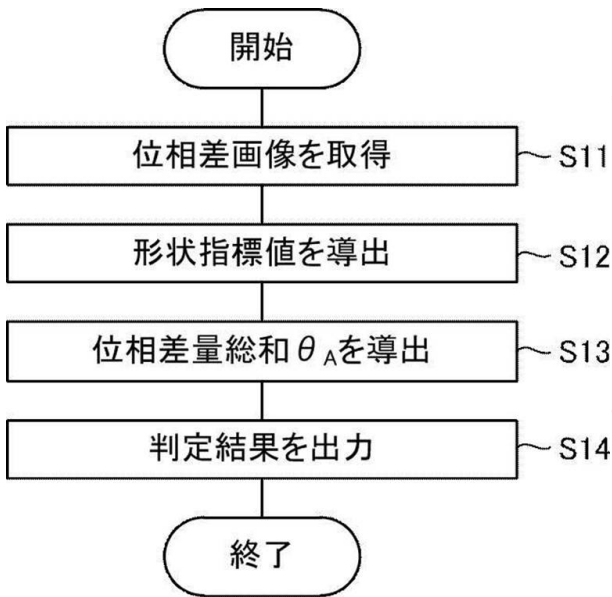
【図12】



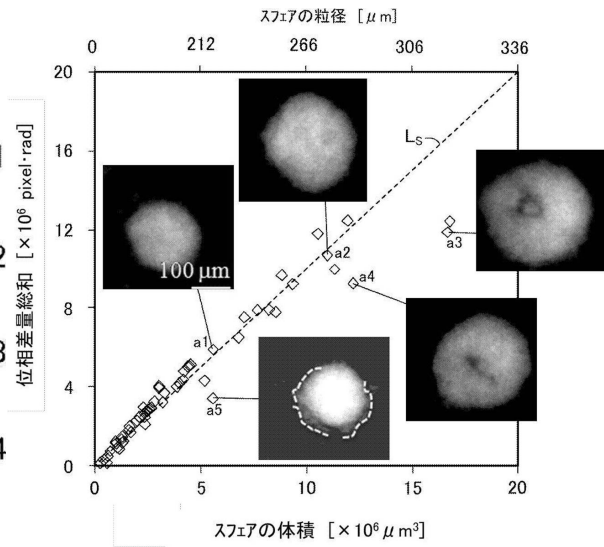
【図13】



【図14】



【図15】



10

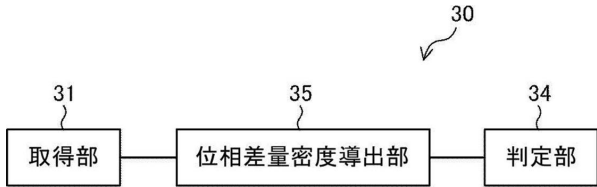
20

30

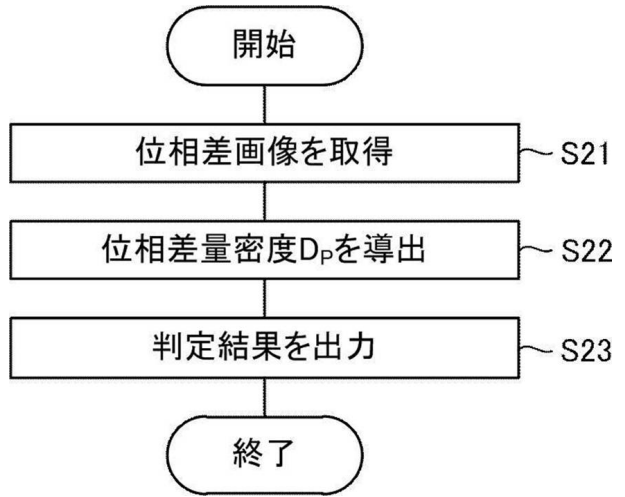
40

50

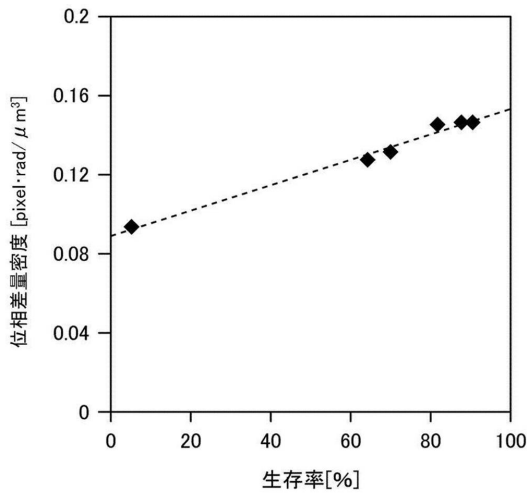
【図 16】



【図 17】



【図 18】



10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 1 0 5 9 2 ( J P , A )  
特表 2 0 1 8 - 5 0 7 3 9 2 ( J P , A )  
特開 2 0 0 3 - 1 5 6 4 2 7 ( J P , A )  
KEMMLER Manuel et al. , Noninvasive time-dependent cytometry monitoring by digital holography , Journal of Biomedical Optics , Vol.12,No.6 , 2007年 , pp.064002-1 - 06400210
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
- |         |           |
|---------|-----------|
| G 0 1 N | 1 5 / 1 4 |
| C 1 2 M | 1 / 3 4   |
| G 0 1 N | 2 1 / 1 7 |
| G 0 3 H | 1 / 2 2   |