

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年9月7日(07.09.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/158947 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 21/41 (2006.01) G02B 21/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) G03H 1/00 (2006.01)

本 周平(YAMAMOTO, Shuhei); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/008568

(22) 国際出願日: 2017年3月3日(03.03.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社島津製作所(SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 山川 倫 誉(YAMAKAWA, Momoyo); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 山

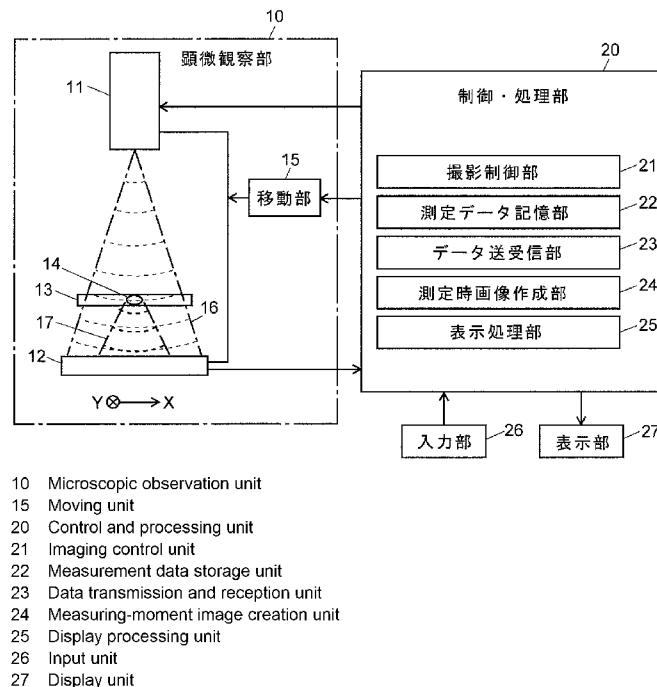
(74) 代理人: 特許業務法人京都国際特許事務所(KYOTO INTERNATIONAL PATENT LAW OFFICE); 〒6008091 京都府京都市下京区東洞院通四条下ル元悪王子町37番地 豊元四条烏丸ビル Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,

(54) Title: CELL OBSERVATION DEVICE

(54) 発明の名称: 細胞観察装置

[図2]



(57) Abstract: In a microscopic observation unit (10), when acquiring hologram data at various measurement positions on a cell culture plate (13) while a light source unit (11) or the like is moved by a moving part (15), a measuring-moment image creation unit (24) creates a thumbnail image by reducing the size of a hologram image based on original data (two-dimensional distribution of light intensity) every time when data is obtained at each of the measurement positions, and a display processing unit (25) pastes the respective obtained thumbnail images so as to sequentially complete a hologram

KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

image of the entire plate to be displayed on a display unit (27). When a measurer, after viewing the hologram image while measurement is being taken, determines that the measurement is not properly performed, the measurer presses a measurement stop button to abort measurement immediately. By this configuration, when there is a flaw in measurement such as contamination of a foreign object in a sample, it becomes possible to abort measurement without having to wait until a phase image or an intensity image is reconstructed at a server at the completion of all measurements on the basis of hologram data, and thereby to avoid spending time on a futile measurement.

(57) 要約：顕微観察部（10）において、移動部（15）により光源部（11）等を移動させつつ細胞培養プレート（13）上の各測定位置のホログラムデータを取得する際に、測定時画像作成部（24）は一つの測定位置についてのデータが得られる毎に原データ（光強度の2次元分布）に基づくホログラム画像を縮小したサムネイル画像を作成し、表示処理部（25）は得られたサムネイル画像を貼り付けることで表示部（27）に表示するプレート全体のホログラム画像を順次完成させる。測定実行中に測定者がホログラム画像を見て測定が適切でないと判断すると、測定停止ボタンを押して直ちに測定を中止させる。これにより、試料に異物が混入している等、測定の不具合がある場合に、全測定終了後にサーバでホログラムデータに基づく位相画像や強度画像が再構成されるよりも前に測定を中止させることができ、無駄な測定に時間を費やすことを回避することができる。

明 細 書

発明の名称：細胞観察装置

技術分野

[0001] 本発明は細胞の状態を観察する細胞観察装置に関し、さらに詳しくは、ホログラフィ顕微鏡により物体波と参照波との干渉縞を記録したホログラムを取得し、そのホログラムデータに基づいて位相情報や強度情報を算出したうえで位相画像や強度画像等を作成する細胞観察装置に関する。

背景技術

[0002] 再生医療分野では、近年、iPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞を用いた研究が盛んに行われている。一般に細胞は透明であって通常の光学顕微鏡では観察しにくいいため、従来、細胞の観察には位相差顕微鏡が広く利用されている。しかしながら、位相差顕微鏡では顕微画像を撮影する際に焦点合わせを行う必要があるため、広い観察対象領域を細かく区画したそれぞれの小領域についての顕微画像を取得するような場合、測定に時間が掛かりすぎるという問題がある。これを解決するため、近年、デジタルホログラフィ技術を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡が開発され実用に供されている（特許文献1、2等参照）。

[0003] デジタルホログラフィック顕微鏡では、光源からの光が物体表面で反射又は透過してくる物体光と同一光源から直接到達する参照光とがイメージセンサ等の検出面で形成する干渉縞（ホログラム）を取得し、そのホログラムに基づいた光波の逆伝播演算処理等を実施することで位相情報や振幅（強度）情報を取得し、再構成画像として強度画像や位相画像を作成する。こうしたデジタルホログラフィック顕微鏡では、ホログラムを取得したあとの演算処理の段階で任意の距離における位相情報等を得ることができるため、撮影時にいちいち焦点合わせを行う必要がないという利点がある。

[0004] デジタルホログラフィック顕微鏡には、インライン（in-line）型、オフアキシス（off-axis）型、位相シフト型などの方式がある。これら各方式では

主として、ホログラムを取得するための光学系の構成が相違している。オフアクシス型では通常、レーザ光源から出射した光を参照光と物体に照射される照射光とに分割し、該照射光に対し物体を透過して来た物体光と参照光とを互いに異なる入射角で以てイメージセンサに入射させる。一方、インライン型では、レーザ光源から出射した光を分割せずに物体に照射し、物体を透過して来た物体光と物体を透過せずに該物体の近傍を通過した参照光とを共にイメージセンサに略垂直に入射させる。また、位相シフト型では、位相シフト干渉計を用い分割した参照光の光路長を複数段階に変化させることで、位相が複数段階に相違するホログラムを取得する。

[0005] いずれの方式であってもデジタルホログラフィック顕微鏡では、取得したホログラムデータに基づいて光波の位相情報及び振幅情報を算出し、それを画像化する処理をコンピュータで行う必要がある。例えば特許文献1、非特許文献1等には、インライン型デジタルホログラフィック顕微鏡で取得される複数の波長光についてのホログラムに基づく光波伝播の反復計算による位相回復方法が提案されているが、こうした計算はかなり複雑で計算量も多い。

[0006] 培養中の生体細胞を観察するための細胞観察装置では、細胞培養プレート全体又は該プレートに形成されているウェル全体の広い範囲について各細胞が詳細に観察できる程度の高い解像度の画像を作成する必要がある。デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた細胞観察装置で、こうした位相画像や強度画像を得るためには、観察対象領域（例えば細胞培養プレート全体）を細かく区切った多数の小領域についてそれぞれホログラムを取得し、そのホログラムに基づく演算処理を行って小領域毎の位相情報や振幅情報の2次元分布を求め、多数の小領域のそうした2次元分布を合成して観察対象領域についての画像を再構成する必要がある。

[0007] 上述したように、位相情報等の算出や画像の再構成処理の計算量はもともと多いため、多数の小領域毎にこうした計算を行う場合、その計算量はかなり膨大になる。そのため、或る程度性能の高いコンピュータを使用したとし

ても、測定を開始してから観察対象領域についての位相画像が再現されるまでには時間が掛かる。

本発明者らの検討によれば、例えば細胞培養プレート全体を800個程度の小領域に分割し、各小領域についてそれぞれ高い解像度（例えば4000×3000画素／枚）で複数の波長についてのホログラムを取得する装置において、測定開始から位相画像の再構成処理が終了するまで1時間以上掛かる。即ち、測定開始時点から1時間以上の時間が経過したあとに、初めて観察対象である試料の位相画像や強度画像の観察が可能となる。

[0008] 観察対象である細胞培養プレート中に異物の混入などの不具合があったり、測定の失敗又は不手際があったりした場合、測定自体が無駄になるが、上述したようにそうした不具合が判明するのは測定開始時点からかなり時間が経過してからである。そのため、測定時間が無駄に費やされてしまうことになり、細胞の観察作業や解析作業の効率を低下させるという問題がある。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際特許公開第2016／084420号

特許文献2：特開平10－268740号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：ペン・バオ（Peng Bao）、ほか3名、「レンズレス・フェーズ・マイクロコピー・ユージング・フェーズ・リトライバル・ウィズ・マルチプル・イルミネーション・ウェーブレンクス（Lensless phase microscopy using phase retrieval with multiple illumination wavelengths）」、アプライド・オプティクス（Applied Optics）、ジ・オプティカル・ソサイエティ・オブ・アメリカ（The Optical Society of America）、2012年、Vol. 51、No. 22、pp. 5486-5494

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は上記課題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、デジタルホログラフィック顕微鏡により取得されたホログラムに基づいて位相回復等の演算処理を行って細胞を含む試料についての位相画像や強度画像を再構成する細胞観察装置において、試料の不具合や測定の不手際などの発生をユーザが迅速に認識することで、不所望のデータの取得を回避することができる細胞観察装置を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 上記課題を解決するために成された本発明は、デジタルホログラフィック顕微鏡を利用した細胞観察装置であって、

- a) コヒーレント光を出射する光源部と、
 - b) 前記光源部からの出射光を細胞を含む試料に照射したときの物体波と参照波との干渉縞であるホログラムを取得する検出部と、
 - c) 前記試料上の測定位置が移動するように前記光源部及び前記検出部と前記試料との一方又は両方を移動させる移動部と、
 - d) 前記移動部により前記試料上の測定位置を移動させつつ所定の観察対象領域内の各測定位置におけるホログラムの取得を繰り返すように前記光源部、前記検出部、及び前記移動部を制御する測定制御部と、
 - e) 前記測定制御部による制御の下で前記検出部で得られたホログラムデータに基づいて位相情報を算出するとともに該位相情報の2次元分布を示す画像を作成する再構成画像作成部と、
 - f) 前記測定制御部による制御の下での測定実行中に、すでに測定が終了した測定位置について前記検出部で得られたホログラムデータに基づき前記観察対象領域の全体又はその一部の光強度分布を示すホログラム画像を作成する測定時画像作成部と、
 - g) 前記測定時画像作成部で作成されたホログラム画像を表示部に表示する表示処理部と、
- を備えることを特徴としている。

[0013] 本発明に係る細胞観察装置では、典型的には、前記試料は細胞培養容器で

あり、前記ホログラフィック顕微鏡によるホログラムデータの取得が可能な最大の領域は前記細胞培養容器全体又はその一部の領域であるものとすることができる。上記細胞培養容器は、一又は複数のウェルが形成された細胞培養プレート、シャーレ、大量培養を目的とした培養フラスコなどである。したがって、本発明に係る細胞観察装置は、こうした細胞培養容器において培養中である生体細胞を観察するのに好適な装置である。

[0014] 本発明に係る細胞観察装置において、移動部は例えば、その位置が固定された細胞培養プレートに対して光源部及び検出部を一体に移動させることで、該細胞培養プレート上で光源部から出射したコヒーレント光が照射される測定位置が変化するものとすることができる。測定制御部は該移動部により例えば光源部及び検出部をステップ状に移動させつつ、細胞培養プレート内の一つの測定位置にコヒーレント光を照射し、それにより検出部の検出面上に形成されるホログラムによる光強度の2次元分布を示すデータ（ホログラムデータ）を取得する、という動作を繰り返す。

[0015] 再構成画像作成部は、検出部で得られたホログラムデータに基づいて位相情報を算出する演算を行うが、それとは別に、測定時画像作成部は、測定の実行中に、すでに測定が終了した測定位置について得られたホログラムデータに基づき、観察対象領域の全体又はその一部の領域の光強度分布を示すホログラム画像を作成する。測定の進行に伴って一つの測定位置についてのホログラムデータが新たに得られる毎に、測定時画像作成部は、観察対象領域の全体又はその一部の光強度分布を示すホログラム画像を更新する。即ち、このホログラム画像は測定の進行に伴ってほぼリアルタイムで更新される。

[0016] 測定時画像作成部で作成されるホログラム画像はホログラムに対応する光強度の2次元分布であるので、透明であって高さも低い生体細胞については十分に可視化されないが、或る程度の大きさの異物や大きな段差があるウェルの縁部などについては十分に識別可能な画像が得られる。そのため、ユーザ（測定者）は測定実行中に表示部に表示されるホログラム画像を確認することで、細胞以外の異物の混入や測定の不適切性などを把握することができ

る。それにより、測定の続行が不要であるとユーザが判断したときには、測定を途中で停止させて無駄な測定を実行することを回避することができる。

[0017] 本発明に係る細胞観察装置において、インライン型、オフアクシス型、位相シフト型などのデジタルホログラフィック顕微鏡の方式は問わないが、光学系の構成が簡素であって試料と光源部との距離を複数段階に変化させる必要がないために駆動機構も簡素になるという点で、複数の波長におけるホログラムを利用するインライン型の構成が望ましい。

[0018] この場合、本発明に係る細胞観察装置において、好ましくは、

前記光源部は複数段階に波長を設定可能であり、

前記測定制御部は各測定位置において前記光源部の出射光の波長を複数段階に切り替えて各波長に対するホログラムを取得するように前記光源部、前記検出部、及び前記移動部を制御し、

前記再構成画像作成部は、同一測定位置に対して得られた互いに異なる複数の波長についてのホログラムデータを用いて位相情報を算出し、

前記測定時画像作成部は、各測定位置における任意の一つの波長についてのホログラムデータに基づき前記観察対象領域の全体又はその一部の光強度分布を示すホログラム画像を作成する構成とすることができる。

[0019] この構成では、光源部の出射光の波長が複数段階に切り替えられるとき、その複数の波長のいずれについてのホログラムデータに基づいてホログラム画像を作成しても構わない。ただし、測定が終了した測定位置におけるホログラム画像を少しでも早く描出するという点からは、前記測定時画像作成部は、互いに異なる複数の波長のうち、最初に測定が実施される波長についてのホログラムデータに基づいてホログラム画像を作成するよい。

[0020] 一方、光源部での出射光の波長切替えの不具合をホログラム画像から把握するためには、互いに異なる複数の波長のうちの最初に測定が実施される波長についてのホログラムデータに基づいてホログラム画像を作成するのではなく、少なくとも1回以上切り替えられたあとの波長についてのホログラムデータに基づいてホログラム画像を作成するとよい。或いは、必ずしも各測

定位置における同じ波長についてのホログラムデータに基づいて全体のホログラム画像を作成する必要はなく、測定位置毎に異なる波長についてのホログラムデータに基づいて全体のホログラム画像を作成してもよい。

[0021] また本発明に係る細胞観察装置において、好ましくは、

前記表示処理部は、前記測定時画像作成部で作成された前記観察対象領域の全体又はその一部のホログラム画像と、実行中である測定を停止する指示をユーザが行うための操作子と、を配置した画面を表示部に表示する構成とするとよい。

[0022] この構成の細胞観察装置では、前記測定制御部は、前記操作子が操作されたのに応じて、実行中である測定を中止する構成とするとよい。上記操作子としては例えばGUI部品の一つであるボタンを用いることができる。

[0023] この構成では、ユーザ（測定者）は測定の実行中に表示部にほぼリアルタイムで表示されるホログラム画像を見ながら、例えば細胞以外の異物の混入がないか、或いは測定が適切に行われているか等を判断し、測定を中止したほうがよいと判断したならば、直ぐに操作子を操作して測定の中止を指示することができる。これにより、簡単な操作で迅速に測定を中止することができる。

[0024] また本発明に係る細胞観察装置において、

前記表示部に表示するホログラム画像の範囲をユーザが指定する範囲指定部をさらに備え、

前記測定時画像作成部は、前記範囲指定部により指定された範囲についてのホログラム画像を作成する構成としてもよい。

[0025] 通常、或る一つの測定位置についてのホログラムを取得する際には最も高い解像度でデータの取得が行われるが、観察対象領域全体等のホログラム画像を作成して表示する際には、その画像の大きさや表示部の画面画素数などに応じて画像の解像度を落とす必要がある。この解像度を下げる処理は測定位置毎に行う必要があるため、表示部に表示するホログラム画像の範囲が狭いほど、つまりその範囲に含まれる測定位置が少ないほど、処理の負担が軽

くなる。上記構成によれば、ユーザが範囲指定部により確認したい範囲を絞ることができるので、それによって測定時画像作成部は不要な処理を行う必要がなくなり、計算の負荷が軽減される。

[0026] また、この場合、前記測定時画像作成部は、前記範囲指定部により指定された範囲の大きさに応じた観察倍率のホログラム画像を作成するようにしてもよい。

[0027] これにより、ユーザは小さな異物等の存在も確認し易くなり、測定を中止すべきか否かの判断をよりの確に行うことができる。

[0028] なお、本発明に係る細胞観察装置において、再構成画像作成部と測定時画像作成部とは同じコンピュータや同一筐体に收容されたハードウェア回路でそれら機能を実現するように構成してもよいが、別々のコンピュータ又は全く別体であるハードウェア回路でそれぞれの機能を実現するように構成してもよい。具体的には例えば、複雑な計算が必要である再構成画像作成部の機能は、測定を担うデジタルホログラフィック顕微鏡本体を制御するパーソナルコンピュータと通信ネットワークを介して接続されるサーバ（高性能なコンピュータ）で実現するようにし、測定時画像作成部の機能はそのパーソナルコンピュータで実現するようにしてもよい。

発明の効果

[0029] 本発明に係る細胞観察装置によれば、測定によって取得されたホログラムデータに基づく複雑な計算の結果作成される位相画像や強度画像が表示されるのを待つことなく、測定の実行中に、ユーザ（測定者）は試料の不具合や測定の不手際などの発生の有無をほぼリアルタイムで表示されるホログラム画像において確認することができる。それによって、そうした不具合が発生したときに迅速に測定を中止させ、測定時間が無駄に費やされることを回避することができる。その結果、効率のよい細胞観察の作業が可能となる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]本発明の一実施例である細胞観察装置の全体構成図。

[図2]本実施例の細胞観察装置における測定用端末の概略構成図。

[図3]本実施例の細胞観察装置における画像再構成処理を説明するための概念図。

[図4]本実施例の細胞観察装置における測定時の測定位置走査の説明図。

[図5]本実施例の細胞観察装置における測定時の波長切替えタイミングの説明図。

[図6]本実施例の細胞観察装置におけるリアルタイム画像表示画面の一例を示す模式図。

[図7]本実施例の細胞観察装置におけるリアルタイム画像表示画面の他の表示例を示す模式図。

[図8]本実施例の細胞観察装置においてリアルタイム画像表示画面に表示される表示画像の実例を示す図。

発明を実施するための形態

[0031] 以下、本発明に係る細胞観察装置の一実施例について、添付図面を参照して説明する。

図1は本実施例の細胞観察装置の全体構成図、図2は本実施例の細胞観察装置における測定用端末の概略構成図である。

[0032] 本実施例の細胞観察装置は、インターネット、イントラネットなどの通信ネットワーク7を介して接続された測定用端末1と、閲覧用端末3と、サーバ5と、を含む。図1には、測定用端末1及び閲覧用端末3をそれぞれ2台ずつ記載しているが、これらはそれぞれ適宜の数だけ設けることができる。

[0033] サーバ5は高性能なコンピュータであり、該コンピュータにインストールされている専用のソフトウェアにより具現化される機能ブロックとして、データ送受信部51、測定データ記憶部52、位相回復演算部53、画像再構成部54、画像データ記憶部55等を備える。

[0034] 測定用端末1は顕微観察部10と制御・処理部20とから成る。本実施例の細胞観察装置では、顕微観察部10はインライン型デジタルホログラフィック顕微鏡であり、図2に示すように、レーザダイオード等を含む光源部11とイメージセンサ12とを備え、光源部11とイメージセンサ12との間

に、観察対象物である細胞 14 を含む細胞培養プレート 13 が配置される。光源部 11 及びイメージセンサ 12 は例えばモータ等の駆動源を含む移動部 15 により、互いに直交する X 軸、Y 軸の二軸方向に一体に移動自在である。

[0035] なお、図 2 では図面が煩雑になるのを避けるために、光源部 11 とイメージセンサ 12 とを一つずつ、つまり一組しか記載していないが、実際には、光源部 11 とイメージセンサ 12 とは一枚の細胞培養プレート 13 を挟んで四組設けられており、後述するように、その四組の光源部 11 とイメージセンサ 12 とにより一枚の細胞培養プレート 13 の異なる測定位置についてのホログラムの取得が可能となっている。

[0036] 制御・処理部 20 の実体は顕微観察部 10 の動作を制御するとともに顕微観察部 10 で取得されたデータを処理するパーソナルコンピュータ（PC）であり、該 PC にインストールされた専用のソフトウェアにより具現化される機能ブロックとして、撮影制御部 21、測定データ記憶部 22、データ送受信部 23、測定時画像作成部 24、表示処理部 25 等を備える。また、制御・処理部 20 には、キーボードやマウス等のポインティングデバイスである入力部 26 と、表示部 27 と、が接続されている。

[0037] 閲覧用端末 3 は測定用端末 1 における制御・処理部 20 と同様に、その実体は一般的な PC である。そして、該 PC にインストールされた専用のソフトウェアにより、サーバ 5 からデータを受領し、該データに基づいて形成される適宜の画像（後述する位相画像や強度画像など）を表示することが可能である。

[0038] 次に、本実施例の細胞解析装置におけるホログラムデータ取得の際の動作について図 3～図 5 を参照して説明する。

図 3 は本実施例の細胞観察装置における画像再構成処理を説明するための概念図、図 4 は本実施例の細胞観察装置における測定時の測定位置走査の説明図、図 5 は本実施例の細胞観察装置における出射光の波長切替えタイミングの説明図である。

[0039] 図3(a)は本実施例の細胞観察装置において使用される細胞培養プレート13の概略上面図である。細胞培養プレート13には六個の上面視円形状のウェル13aが形成されており、その各ウェル13a内で細胞が培養される。ここでは、この一つの細胞培養プレート13全体、つまりは六個のウェル13aを含む矩形状の範囲全体が観察対象領域である。上述したように、顕微観察部10は四組の光源部11及びイメージセンサ12を備えており、各組の光源部11及びイメージセンサ12はそれぞれ、細胞培養プレート13全体を4等分した四つの4分割範囲81のホログラムデータの収集を担う。つまり、四組の光源部11及びイメージセンサ12が細胞培養プレート13全体に亘るホログラムデータの収集を分担している。

[0040] 一組の光源部11及びイメージセンサ12が1回に測定可能である範囲は、図2(b)及び(c)に示すように、4分割範囲81の中の1個のウェル13aを含む略正形状の範囲82をX軸方向に10等分、Y軸方向に12等分して得られる一つの撮像単位83に相当する範囲である。一つの4分割範囲81は $15 \times 12 = 180$ 個の撮像単位83を含む。この一つの撮像単位83が本発明における「測定位置」である。四つの光源部11と四つのイメージセンサ12はそれぞれ光源部11及びイメージセンサ12を含むX-Y面内で、4分割範囲81と同じ大きさの矩形の四つの頂点付近にそれぞれ配置されおり、細胞培養プレート13上の異なる四つの撮像単位83についてのホログラムの取得を同時に行う。

[0041] 細胞培養プレート13についてのデータ収集に際し、観察者はまず、観察対象である細胞(多能性細胞)14が培養されている細胞培養プレート13を顕微観察部10の所定位置にセットし、該細胞培養プレート13を特定する識別番号や測定日時などの情報を入力部26から入力したうえで測定実行を指示する。この測定指示を受けて撮影制御部21は、顕微観察部10の各部を制御して測定を開始する。

[0042] 即ち、撮影制御部21による制御の下で一つの光源部11は、 10° 程度の微小角度の広がりを持つコヒーレント光を細胞培養プレート13の所定の

領域（一つの撮像単位 83）に照射する。細胞培養プレート 13 及び細胞 14 を透過したコヒーレント光（物体光 17）は、細胞培養プレート 13 上で細胞 14 に近接する領域を透過した光（参照光 16）と干渉しつつイメージセンサ 12 に到達する。物体光 17 は細胞 14 を透過する際に位相が変化した光であり、他方、参照光 16 は細胞 14 を透過しないので該細胞 14 に起因する位相変化を受けない光である。したがって、イメージセンサ 12 の検出面（像面）上には、細胞 14 により位相が変化した物体光 17 と位相が変化していない参照光 16 との干渉像、つまりホログラムがそれぞれ形成され、このホログラムに対応する 2 次元的な光強度分布データ（ホログラムデータ）がイメージセンサ 12 から出力される。

[0043] 上述したように、四つの光源部 11 からは略同時に細胞培養プレート 13 に向けてコヒーレント光が出射され、四つのイメージセンサ 12 では細胞培養プレート 13 上の異なる撮像単位 83 に対応する領域のホログラムデータが取得される。一つの測定位置での測定が終了する毎に、光源部 11 及びイメージセンサ 12 は移動部 15 により、X-Y 面内で一つの撮像単位 83 に相当する距離だけ X 軸方向、Y 軸方向にステップ状に移動される。例えば図 4 に示すように、一つの 4 分割範囲 81 において一番目の撮像単位 83 a から X 軸方向に順に測定位置が移動し、最終的には最後の撮像単位 83 b での測定が行われるように、或る一組の光源部 11 及びイメージセンサ 12 は細胞培養プレート 13 に対して順次移動される。これにより、4 分割範囲 81 に含まれる 180 個の撮像単位 83 での測定が実施され、四組の光源部 11 及びイメージセンサ 12 全体で細胞培養プレート 13 全体の測定が実際されることになる。

[0044] また本実施例の細胞観察装置では、サーバ 5 で位相情報を復元する演算を行うために、同じ物体についてつまりは一つの撮像単位 83 について、複数（ここでは四つ）の異なる波長の光についてのホログラムを取得する。そこで、細胞培養プレート 13 上で一つの撮像単位 83 に対応する領域についての測定を行う際に、光源部 11 から出射されるコヒーレント光の波長を予め

定めた四つの段階に順次切り替え、その各波長光に対してそれぞれホログラムデータを収集する。具体的には、図5に示すように、一つの測定位置において、出射光の波長をA→B→C→Dと順に切り替え、各波長についてそれぞれホログラムデータを取得したならば、移動部15により次の測定位置まで光源部11及びイメージセンサ12を移動させる。

このようにして、顕微観察部10では、細胞培養プレート13上の720個の撮像単位83に対応する領域について、それぞれ四つの波長（A、B、C、D）に関するホログラムデータを漏れなく得ることができる。

[0045] 上述したように顕微観察部10の四つのイメージセンサ12で得られたホログラムデータは、制御・処理部2において測定データ記憶部22に一旦格納される。データ送受信部23は、測定データ記憶部22に格納されたホログラムデータを測定日時等の属性情報とともに、逐次、通信ネットワーク7を介してサーバ5に転送する。複数の測定用端末1は同時に稼働可能であり、各測定用端末1で収集されたホログラムデータは通信ネットワーク7を介して1台のサーバ5に集約される。なお、各測定用端末1からサーバ5へは生の、つまりは加工されていないホログラムデータを送ればよいが、必要に応じて、各測定用端末1に固有の誤差要因を補正するような加工処理を施したホログラムデータをサーバ5へ送るようにしてもよい。

[0046] サーバ5においてデータ送受信部51は各測定用端末1から送られて来たホログラムデータを受け取り、測定用端末1を特定するための識別情報、撮影時に入力された細胞培養プレートの識別情報や測定日時などの属性情報とともにホログラムデータを測定データ記憶部52に蓄積する。このようにしてデータを収集しつつ又は収集したあと、位相回復演算部53は測定データ記憶部52からホログラムデータを適宜読み出し、光波の伝播計算処理を行うことで位相情報を復元するとともに振幅情報を求める。位相情報や振幅情報の空間分布は撮像単位83毎に求まるから、全ての撮像単位83の位相情報や振幅情報が得られたならば、画像再構成部54は、その位相情報や振幅情報に基づいて、観察対象領域全体の位相画像や強度画像を形成する。

[0047] 具体的に画像再構成部 5 4 は、撮像単位 8 3 毎に算出された位相情報の空間分布に基づき各撮像単位 8 3 の位相画像を再構成し、その狭い範囲の位相画像を繋ぎ合わせるタイリング処理（図 2（d）参照）を行うことで、観察対象領域つまりは細胞培養プレート 1 3 全体についての位相画像を形成する。もちろん、タイリング処理の際には撮像単位 8 3 の境界での位相画像が滑らか繋がるように適宜の補正処理を行うとよい。なお、こうした位相情報の算出や画像の再構成の際には、特許文献 1、2 等の既知の文献に開示されているアルゴリズムを利用すればよい。また、通常の処理で得られる再構成画像は取得されたホログラムデータにより原理的に求まる最高解像度の画像であるが、それだけでなく、その最高解像度の位相画像を元に、ビニング処理等により解像度を落とした複数段階の解像度（倍率）の位相画像を作成するようにしてもよい。そして、こうして作成した位相画像を構成する画像データを画像データ記憶部 5 5 に格納する。

[0048] サーバ 5 の性能にも依るが、位相回復演算部 5 3 や画像再構成部 5 4 における処理は複雑で時間が掛かる。そのため、たとえ測定用端末 1 側で全ての測定が終了しても、直ちにその測定結果に基づく位相画像や強度画像を閲覧することはできない。そのため、例えばウェル 1 3 a 中に異物が混入しているような場合に、そのことを位相画像や強度画像で測定者が把握するのは時間的にあとである。そこで、本実施例の細胞観察装置では、以下のようにして、測定実行中に異物の混入や測定の不具合を迅速に把握することができるようにしている。

[0049] 測定実行前に測定者が入力部 2 6 で所定の操作を行うと、表示処理部 2 5 は、図 6 に示すようなリアルタイム画像表示画面 1 0 0 を表示部 2 7 に表示する。このリアルタイム画像表示画面 1 0 0 には、画像表示欄 1 0 1 と情報表示欄 1 0 2 とが配置されており、さらに右下には、「停止」ボタンが配置されている。情報表示欄 1 0 2 には、測定中（又は測定しようとしている）細胞培養プレート 1 3 の名称（プレート名）や識別番号（プレート ID）などの属性情報が表示される。ただし、図 6 に示したのは測定実行中のリアル

タイム画像表示画面 100 であるため画像表示欄 101 に実質的な画像が表示されているが、測定の開始前には画像表示欄 101 には実質的な画像は何も表示されていない。

[0050] 測定が開始されて上述したように細胞培養プレート 13 上での各撮像単位 83 に対応する領域についての複数波長のホログラムデータが得られると、該データは測定データ記憶部 22 に格納されるが、測定時画像作成部 24 はこれと並行して、一つの撮像単位 83 に対応する領域についての最初の波長の、つまりは波長 A に関するホログラムデータが得られると、そのデータに基づいて光強度の 2 次元分布を示すホログラム画像を作成する。このときに作成されるホログラム画像の大きさ、つまり解像度は画像表示欄 101 に表示される画像の範囲に依存する。図 6 に示した例は、画像表示欄 101 に細胞培養プレート 13 全体のホログラム画像を表示する場合であり、このとき一つの撮像単位 83 に対応するホログラム画像は最小になる。つまり、このとき、測定時画像作成部 24 は、一つの撮像単位 83 に対応する領域から得られるホログラムデータに基づいて、光強度の 2 次元分布を示す解像度が最低であるサムネイル画像を作成する。そして、表示処理部 25 は作成されたホログラム画像のサムネイル画像を、リアルタイム画像表示画面 100 中の画像表示欄 101 内の所定領域に貼り付けて表示する。

[0051] 測定時画像作成部 24 は、測定によって得られた光強度の 2 次元分布の解像度を落とす以外の画像処理を実質的に行うことなくホログラム画像を縮小したサムネイル画像を作成し、表示処理部 25 はその画像をそのまま表示する。したがって、或る波長に関するホログラムデータが得られると、殆ど時間遅れなく（つまりはほぼリアルタイムで）そのデータに基づくホログラム画像が表示部 27 に表示される。そして、次の撮像単位 83 に相当する領域についての波長 A に関するホログラムデータが新たに取得され、そのデータに基づくホログラム画像を縮小したサムネイル画像が作成されると、表示部 27 の画面上ではそのサムネイル画像が表示上に追加される。図 6 では、こうしてすでに表示されているサムネイル画像を符号 101 a で、測定中又は

画像作成中であるサムネイル画像の位置を符号 101b で、未だ測定が実施されていないサムネイル画像の位置を符号 101c で示している。

[0052] 図8はリアルタイム画像表示画面100に表示される表示画像の実例を示す図である。この図から分かるように、画像表示欄101に表示されるホログラム画像はホログラムデータそのものであるものの、ウェル13aの縁部の段差や細胞に比べれば十分に高さがありしかも透明ではない異物などは明瞭に描出される。また、一部の光源部11が出射光を発していない、一部のイメージセンサ12の画素が損傷しているといった装置の不具合や測定上の不手際の多くも、それに起因する現象が画像に現れる。そこで、測定の実行中に測定者は画像表示欄101に表示されるホログラム画像を監視し、何らかの問題があると判断できる場合には、入力部26で「停止」ボタン103をクリック操作する。すると、撮影制御部21はこの操作を受けて測定を停止する。このように、測定に何らかの問題がある場合に測定を速やかに停止させることで、残りの無駄な測定に時間を費やすことを回避することができる。また、例えば異物の混入が疑われる場合に、測定者は速やかに細胞培養プレート13を調べ、その原因を究明したり測定をやり直したりすることができる。

[0053] 図6は、細胞培養プレート13全体のホログラム画像を画像表示欄101に表示した例であるが、そのうちの一部を選択的に画像表示欄101に表示させることもできる。図7は一つの4分割範囲81に対応するホログラム画像を画像表示欄101に表示させるようにした例である。このように、測定者が確認したい部分のみを拡大して表示させることで、例えば小さな異物なども見つけ易くなる。また、画像表示欄101上に表示すべき撮像単位83に対応する領域の数が少なくて済むので、上述したようにホログラムデータに基づいて解像度を落としたサムネイル画像を作成する際に、その解像度を落とす画像処理を行う対象を減らすことができる。それによって、コンピュータのCPUの負荷を減らすことができ、画像表示などの一層の迅速化を図ることができる。

[0054] なお、上記実施例において顕微観察部 10 はインライン型デジタルホログラフィック顕微鏡であるが、顕微観察部 10 は観察対象領域中の測定位置毎にホログラムを取得するものであればよいので、インライン型に限らず、オフアクシス型や位相シフト型のデジタルホログラフィック顕微鏡であってもよい。また、光源部 11 からの出射光の波長を切り替えることで複数のホログラムを取得するものに限らず、例えば細胞培養プレートを X 軸、Y 軸に共に直交する Z 軸方向に複数段階に移動させて複数のホログラムを取得するものにも本発明を適用することができる。

[0055] また、上記実施例では、測定用端末 1 と通信ネットワーク 7 を介して接続されたサーバ 5 において位相回復等の演算処理を実施していたが、スタンダオン型の装置で全ての処理を実施する構成としてもよいことは当然である。

[0056] さらにまた、上記実施例及び上記記載の変形例はいずれも本発明の一例であり、本発明の趣旨の範囲でさらに適宜の変更、修正、追加を行っても本願特許請求の範囲に包含されることは当然である。

符号の説明

- [0057] 1 …測定用端末
10 …顕微観察部
11 …光源部
12 …イメージセンサ
13 …細胞培養プレート
13a …ウェル
14 …細胞
15 …移動部
16 …参照光
17 …物体光
2 …制御・処理部
20 …制御・処理部

- 2 1 …撮影制御部
- 2 2 …測定データ記憶部
- 2 3 …データ送受信部
- 2 4 …測定時画像作成部
- 2 5 …表示処理部
- 2 6 …入力部
- 2 7 …表示部
- 3 …閲覧用端末
- 5 …サーバ
- 5 1 …データ送受信部
- 5 2 …測定データ記憶部
- 5 3 …位相回復演算部
- 5 4 …画像再構成部
- 5 5 …画像データ記憶部
- 7 …通信ネットワーク
- 1 0 0 …リアルタイム画像表示画面
- 1 0 1 …画像表示欄
- 1 0 2 …情報表示欄
- 1 0 3 …「停止」ボタン

請求の範囲

[請求項1]

ホログラフィック顕微鏡を利用した細胞観察装置であって、

a)コヒーレント光を出射する光源部と、

b)前記光源部からの出射光を細胞を含む試料に照射したときの物体波と参照波との干渉縞であるホログラムを取得する検出部と、

c)前記試料上の測定位置が移動するように前記光源部及び前記検出部と前記試料との一方又は両方を移動させる移動部と、

d)前記移動部により前記試料上の測定位置を移動させつつ所定の観察対象領域内の各測定位置におけるホログラムの取得を繰り返すように前記光源部、前記検出部、及び前記移動部を制御する測定制御部と、

e)前記測定制御部による制御の下で前記検出部で得られたホログラムデータに基づいて位相情報を算出するとともに該位相情報の2次元分布を示す画像を作成する再構成画像作成部と、

f)前記測定制御部による制御の下での測定実行中に、すでに測定が終了した測定位置について前記検出部で得られたホログラムデータに基づき前記観察対象領域の全体又はその一部の光強度分布を示すホログラム画像を作成する測定時画像作成部と、

g)前記測定時画像作成部で作成されたホログラム画像を表示部に表示する表示処理部と、

を備えることを特徴とする細胞観察装置。

[請求項2]

請求項1に記載の細胞観察装置であって、

前記光源部は複数段階に波長を設定可能であり、

前記測定制御部は各測定位置において前記光源部の出射光の波長を複数段階に切り替えて各波長に対するホログラムを取得するように前記光源部、前記検出部、及び前記移動部を制御し、

前記再構成画像作成部は、同一測定位置に対して得られた互いに異なる複数の波長についてのホログラムデータを用いて位相情報を算出

し、

前記測定時画像作成部は、各測定位置における任意の一つの波長についてのホログラムデータに基づき前記観察対象領域の全体又はその一部の光強度分布を示すホログラム画像を作成することを特徴とする細胞観察装置。

[請求項3] 請求項2に記載の細胞観察装置であって、

前記測定時画像作成部は、互いに異なる複数の波長のうち、最初に測定が実施される波長についてのホログラムデータに基づいてホログラム画像を作成することを特徴とする細胞観察装置。

[請求項4] 請求項1に記載の細胞観察装置であって、

前記表示処理部は、前記測定時画像作成部で作成された前記観察対象領域の全体又はその一部のホログラム画像と、実行中である測定を停止する指示をユーザが行うための操作子と、を配置した画面を表示部に表示することを特徴とする細胞観察装置。

[請求項5] 請求項4に記載の細胞観察装置であって、

前記測定制御部は、前記操作子が操作されたのに応じて、実行中である測定を中止することを特徴とする細胞観察装置。

[請求項6] 請求項1に記載の細胞観察装置であって、

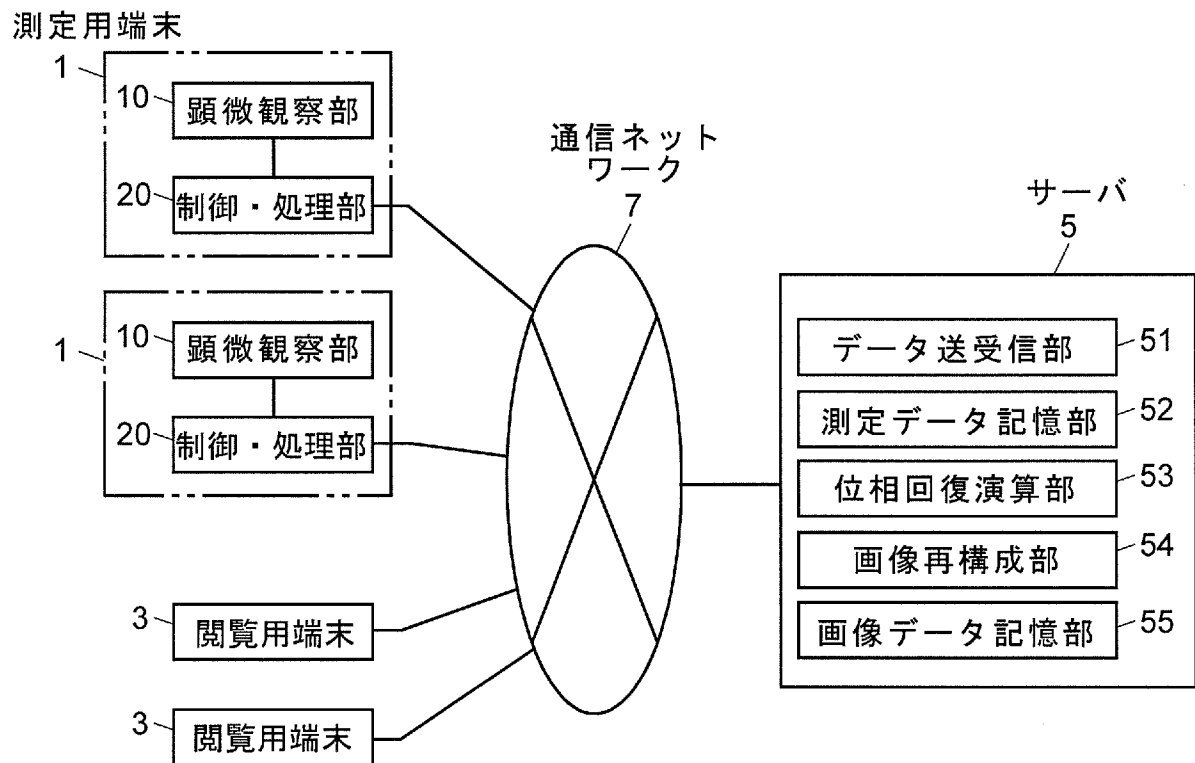
前記表示部に表示するホログラム画像の範囲をユーザが指定する範囲指定部をさらに備え、

前記測定時画像作成部は、前記範囲指定部により指定された範囲についてのホログラム画像を作成することを特徴とする細胞観察装置。

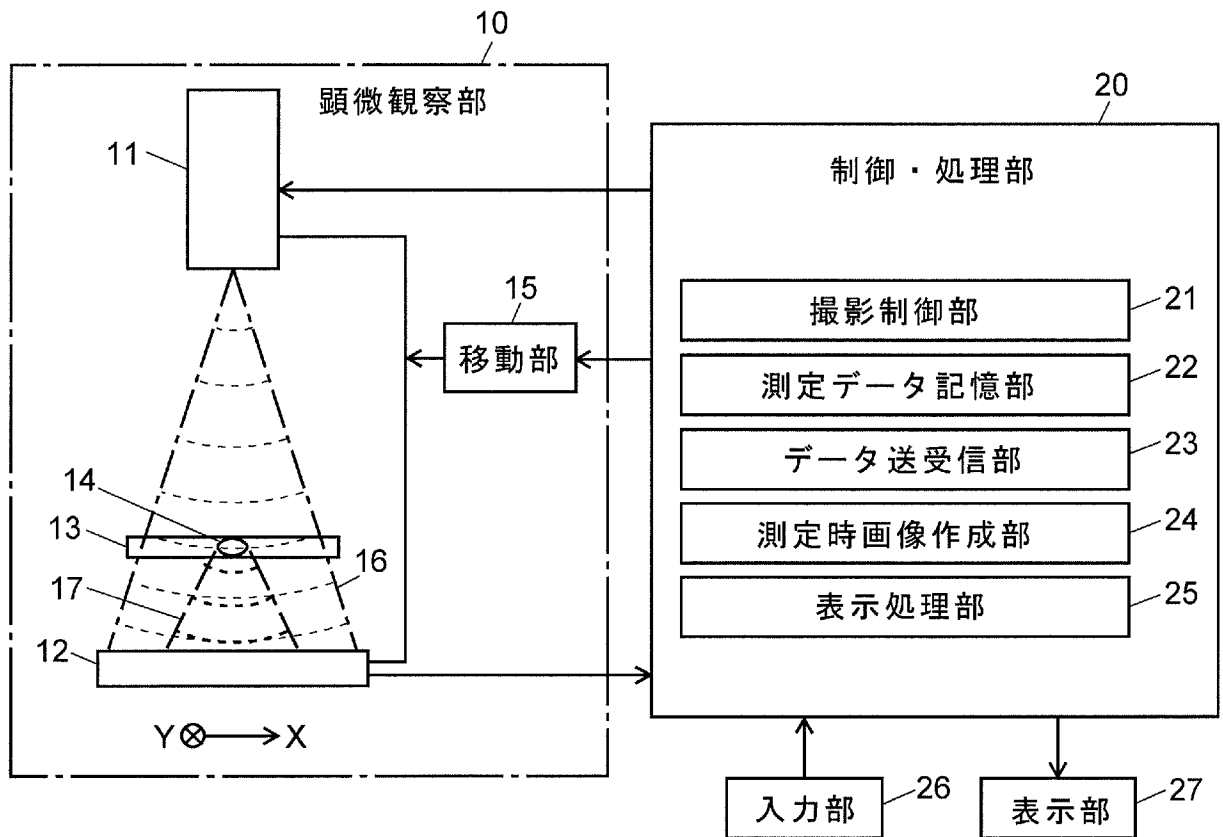
[請求項7] 請求項6に記載の細胞観察装置であって、

前記測定時画像作成部は、前記範囲指定部により指定された範囲の大きさに応じた観察倍率のホログラム画像を作成することを特徴とする細胞観察装置。

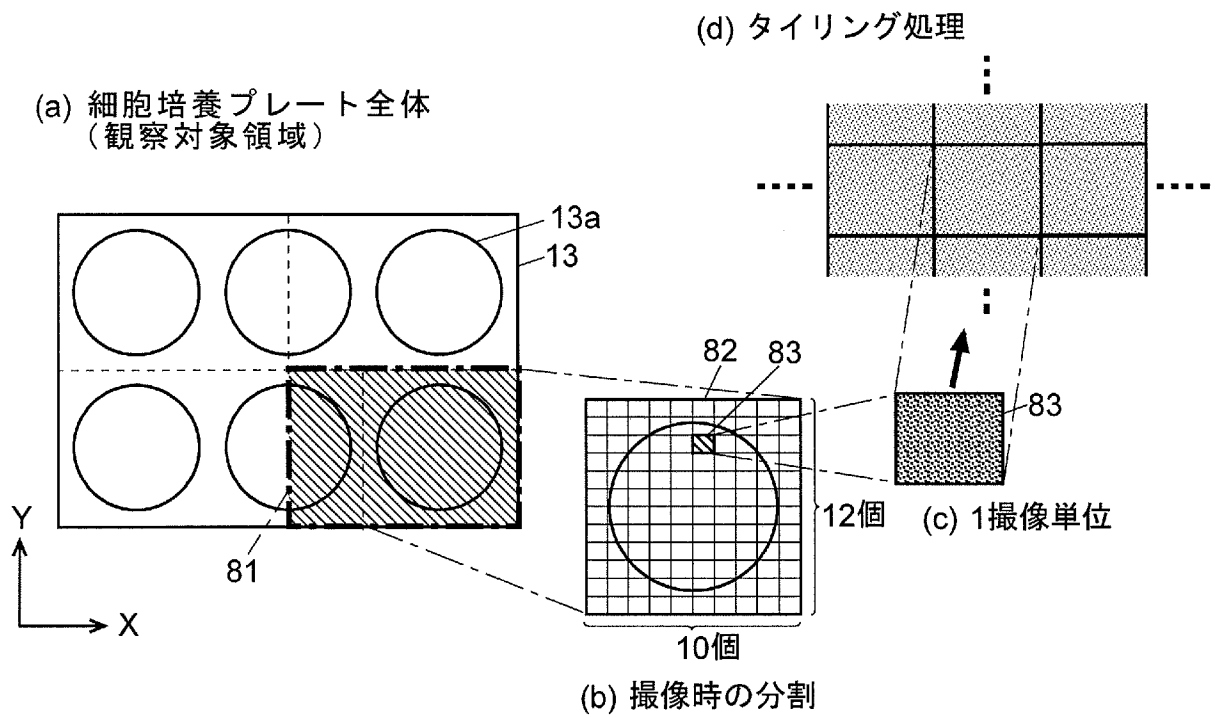
[図1]



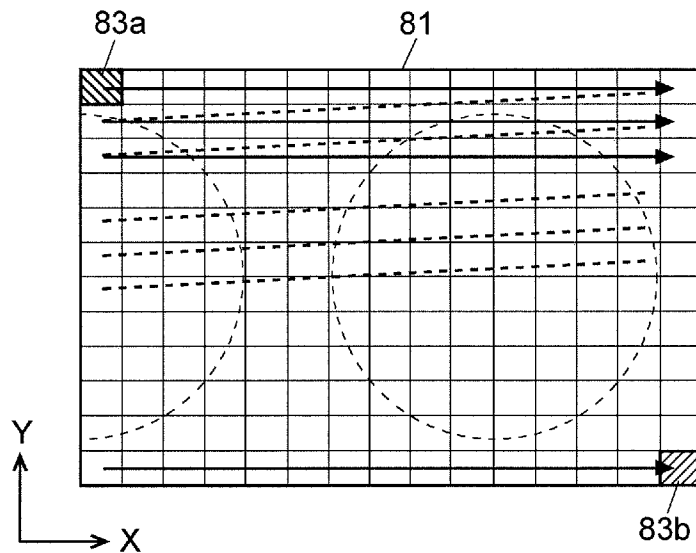
[図2]



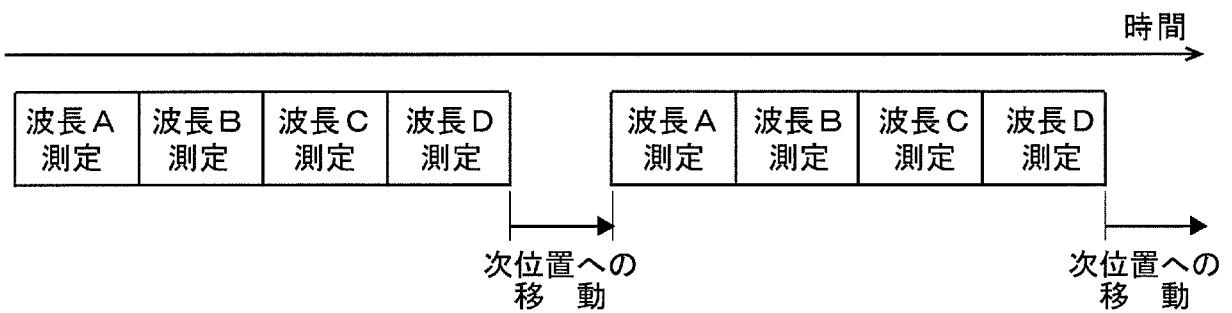
[図3]



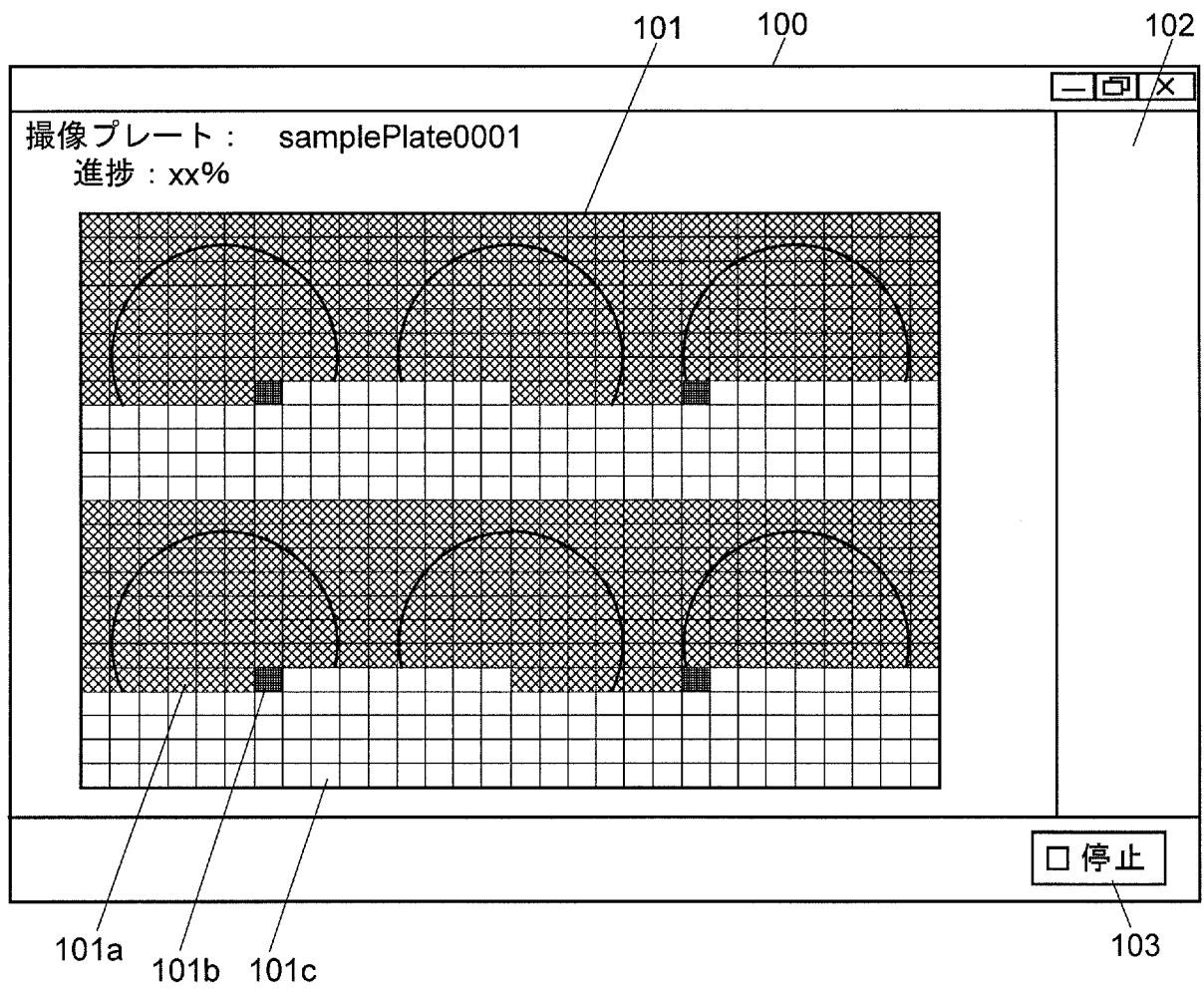
[図4]



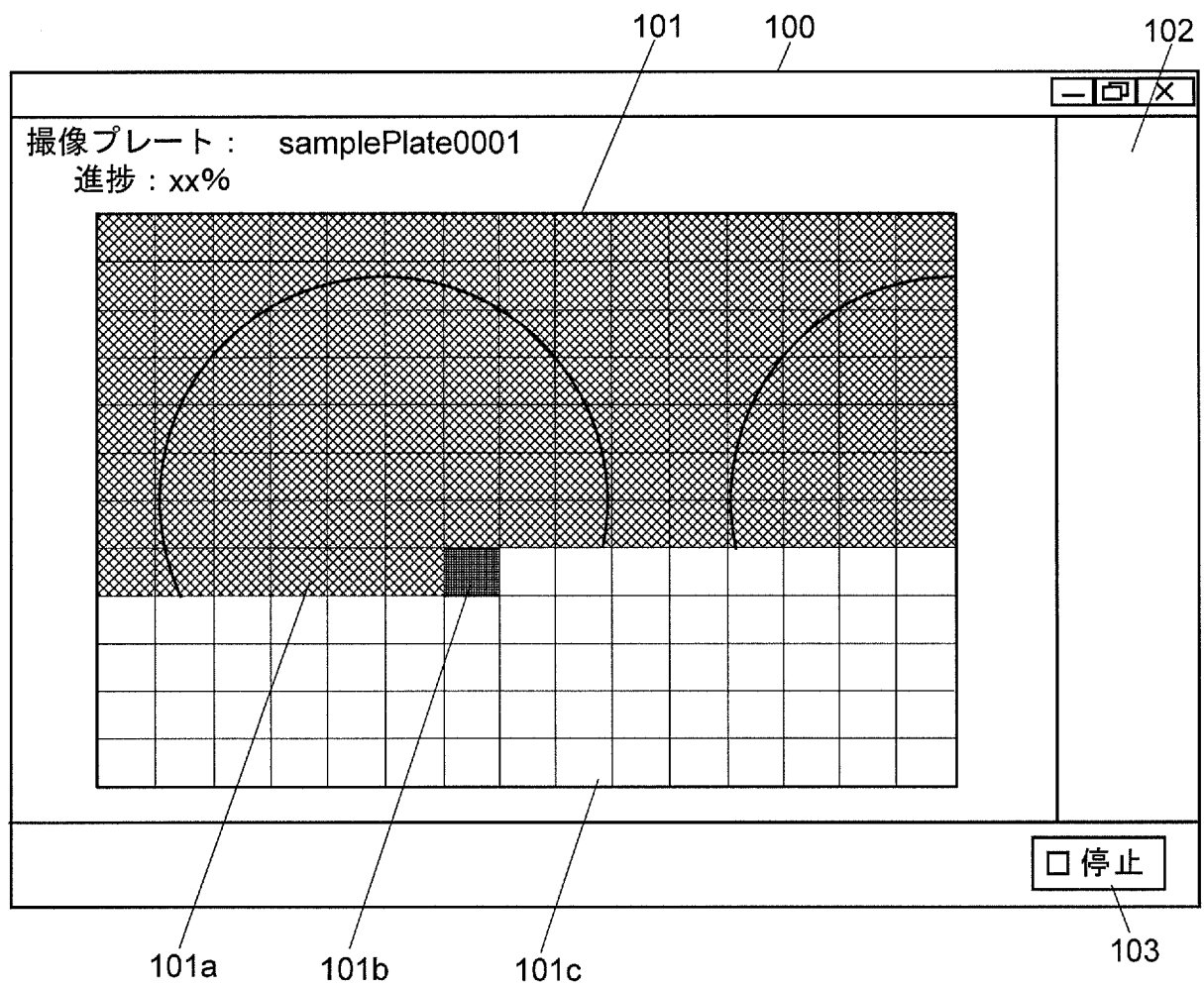
[図5]



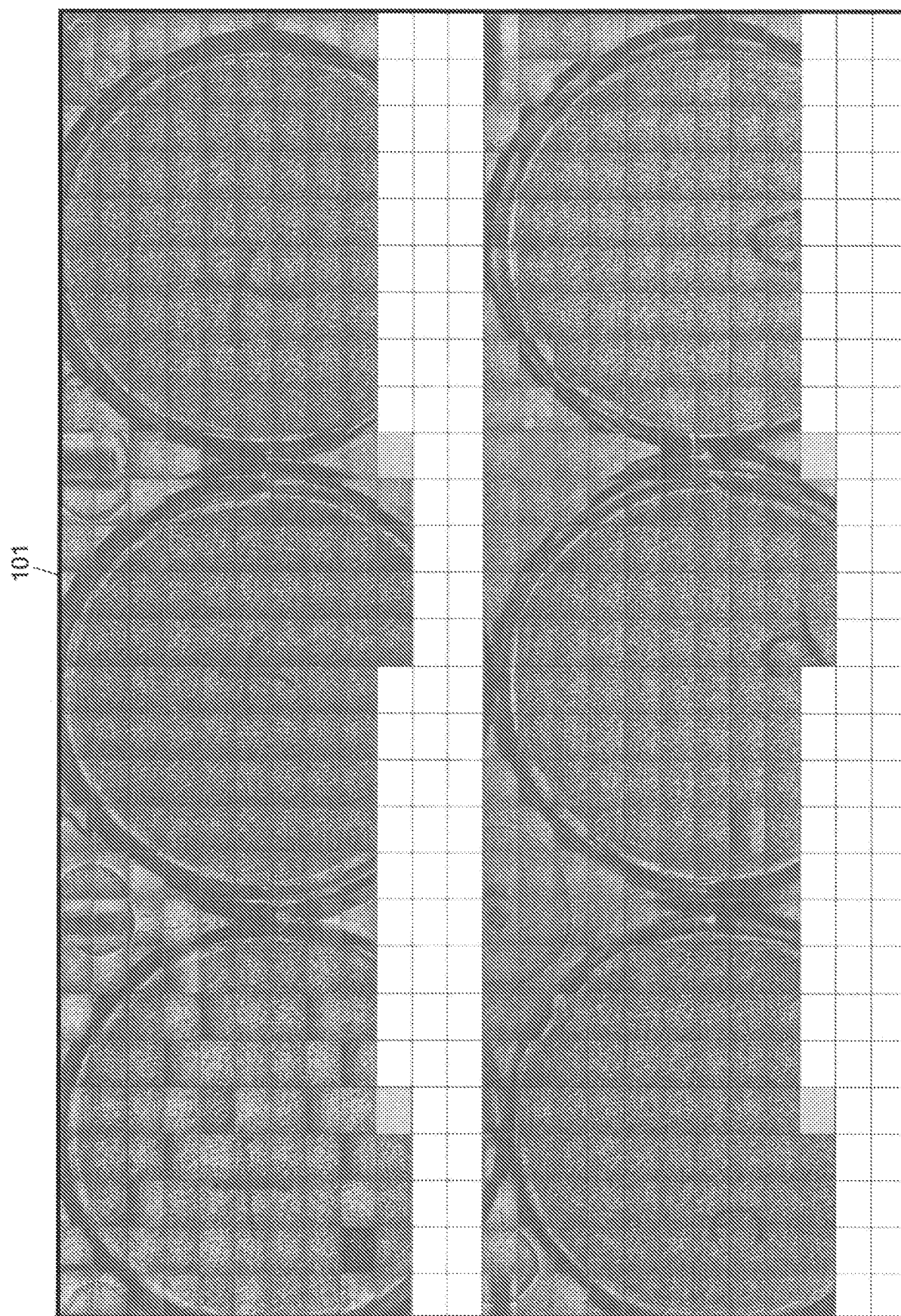
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/008568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/41(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G02B21/00(2006.01)i, G03H1/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/00-21/61, C12M1/34, G02B21/00, G03H1/00, G01B9/00, G01B11/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-170212 A (Nikon Corp.), 01 September 2011 (01.09.2011), paragraphs [0002], [0036] to [0060], [0063] to [0074]; fig. 3 to 5 (Family: none)	1-7
Y	WO 2011/089908 A1 (Nikon Corp.), 28 July 2011 (28.07.2011), paragraphs [0014] to [0109]; fig. 1 to 10 & US 2013/0027539 A1 paragraphs [0047] to [0142]; fig. 1 to 10 & CN 102712890 A	1-7

☒ 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
12 May 2017 (12.05.17)

Date of mailing of the international search report
23 May 2017 (23.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/008568

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/070287 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 16 May 2013 (16.05.2013), paragraphs [0098] to [00100]; fig. 9A to 10I & US 2014/0300696 A1	1-7
Y	US 2008/0137933 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA), 12 June 2008 (12.06.2008), paragraphs [0160] to [0185]; fig. 9, 12 to 13 & WO 2007/002898 A2	1-7
Y	JP 2004-012201 A (Toshiba Solutions Corp.), 15 January 2004 (15.01.2004), paragraph [0032]; fig. 1 (Family: none)	4-5
Y	JP 2009-175330 A (Olympus Corp.), 06 August 2009 (06.08.2009), paragraph [0059]; fig. 5 (Family: none)	4-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/41(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, G02B21/00(2006.01)i, G03H1/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/00-21/61, C12M1/34, G02B21/00, G03H1/00, G01B9/00, G01B11/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
Y	JP 2011-170212 A (株式会社ニコン) 2011.09.01, [0002]、[0036] - [0060]、[0063] - [0074]、図3 - 図5 (ファミリーなし)	1-7
Y	WO 2011/089908 A1 (株式会社ニコン) 2011.07.28, [0014] - [0109]、図1 - 図10 & US 2013/0027539 A1, [0047]-[0142], Fig.1-Fig.10 & CN 102712890 A	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.2017

国際調査報告の発送日

23.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横尾 雅一

2W

3716

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2013/070287 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2013.05.16, [0098] – [00100], FIG. 9A – FIG. 10I & US 2014/0300696 A1	1-7
Y	US 2008/0137933 A1 (UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA) 2008.06.12, [0160] – [0185], Fig. 9、Fig. 12 – Fig. 13 & WO 2007/002898 A2	1-7
Y	JP 2004-012201 A (東芝ソリューション株式会社) 2004.01.15, [0032]、図1 (ファミリーなし)	4-5
Y	JP 2009-175330 A (オリンパス株式会社) 2009.08.06, [0059]、図5 (ファミリーなし)	4-5