

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5293733号
(P5293733)

(45) 発行日 平成25年9月18日(2013.9.18)

(24) 登録日 平成25年6月21日(2013.6.21)

(51) Int. Cl.		F I	
G02B	21/36	(2006.01)	G02B 21/36
G02B	7/28	(2006.01)	G02B 7/11
C12M	1/00	(2006.01)	C12M 1/00
C12M	1/34	(2006.01)	C12M 1/34

請求項の数 9 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2010-500543 (P2010-500543)	(73) 特許権者	000004112
(86) (22) 出願日	平成21年1月27日 (2009.1.27)		株式会社ニコン
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/000308		東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
(87) 国際公開番号	W02009/107321	(74) 代理人	100072718
(87) 国際公開日	平成21年9月3日 (2009.9.3)		弁理士 古谷 史旺
審査請求日	平成24年1月26日 (2012.1.26)	(74) 代理人	100116001
(31) 優先権主張番号	特願2008-47270 (P2008-47270)		弁理士 森 俊秀
(32) 優先日	平成20年2月28日 (2008.2.28)	(72) 発明者	清田 泰次郎
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都千代田区有楽町一丁目12番1号 株式会社ニコン内
		審査官	原田 英信

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置および細胞培養装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対物レンズを有し、観察対象物を観察する観察光学系と、
前記観察対象物と前記観察光学系の焦点位置との相対的な位置関係を光軸方向に調整する駆動部と、

撮影画面に対応する複数の画素を有し、前記観察光学系を介して観察される前記観察対象物を撮像し、前記撮影画面の位相差画像の画像データを取得する撮像部と、

前記駆動部および前記撮像部を制御して、前記観察対象物と前記観察光学系の焦点位置とを前記光軸方向に相対的に移動させつつ前記観察対象物を撮像させ、前記光軸方向の位置情報に関連付けて複数の位相差画像の画像データをメモリする制御部と、

前記複数の位相差画像の画像データに基づき、前記撮影画面の同一位置の画素に関して前記光軸方向の位置関係が異なる状態で取得された複数の画素の出力信号を画像処理して、前記撮影画面の画素における前記観察光学系の合焦位置を求める合焦位置演算部と、

前記合焦位置演算部の出力情報に基づき、前記撮影画面の画素の位置情報と前記画素における前記合焦位置の情報とを求め、前記観察対象物の三次元情報を生成する三次元情報演算部と、

を備えることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項2】

請求項1に記載の顕微鏡装置において、

前記観察光学系は、

リング絞りと、
一部の光の位相を変化させる位相リングと、
観察対象物を透過した直接光と観察対象物の回折光との位相差で生じる像を前記撮像部に結像させる対物レンズと、をさらに有することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の顕微鏡装置において、
 前記合焦位置演算部は、前記複数の画素の出力信号から輝度情報を求め、前記輝度情報の最大値あるいは最小値に基づき前記観察光学系の合焦位置を求めることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 4】

請求項 1 または請求項 2 に記載の顕微鏡装置において、
 前記観察光学系は、前記観察対象物により生じる位相差を輝度値に変換させて結像し、
 前記観察対象物である位相物体の画像データに基づき、前記観察光学系の視野のうちで前記位相物体が位置する第 1 領域と前記位相物体が位置しない第 2 領域とを分離する領域分離部をさらに備え、
 前記領域分離部は、複数の前記画像データから前記視野の各位置における輝度値または輝度分散値を求めるとともに、前記輝度値または前記輝度分散値に基づいて前記第 1 領域および前記第 2 領域を分離することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の顕微鏡装置において、
 前記合焦位置演算部は、注目画素の輝度値が前記第 2 領域から求めた輝度閾値より小さくなる場合には、前記輝度値が最小となる前記注目画素の光軸上の位置を前記合焦位置として求めるとともに、前記注目画素の輝度値が前記輝度閾値以上となる場合には、前記輝度値が最大となる前記注目画素の光軸上の位置を前記合焦位置として求めることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 6】

請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置において、
 前記三次元情報演算部は、前記観察対象物の三次元情報を用いて、前記観察対象物の領域における位相物体の体積を推定することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 7】

請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置において、
 前記三次元情報演算部は、前記観察対象物の三次元情報を用いて、前記観察対象物のうちから浮遊する位相物体を抽出することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の顕微鏡装置において、
 前記三次元情報演算部は、前記観察対象物である培養細胞の三次元情報を用いて前記培養細胞の領域のうちから浮遊細胞を抽出するとともに、前記培養細胞の領域から前記浮遊細胞を除外して細胞の体積を推定することを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項 9】

所定の環境条件で細胞を培養する恒温室と、
 請求項 1 から請求項 8 のいずれか 1 項に記載の顕微鏡装置と、
 を備えることを特徴とする細胞培養装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、顕微鏡装置および細胞培養装置に関する。

【背景技術】

【0002】

従来から細胞の構造や機能を解析するために、顕微鏡観察によって細胞の三次元情報を取得することが従来から行われている。一例として、特許文献 1 には、共焦点レーザ顕微

10

20

30

40

50

鏡で細胞を走査して三次元情報を取得する構成が開示されている。

【特許文献1】特開2006-23476号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、上記のように共焦点レーザ顕微鏡で細胞の三次元情報を取得する場合には、蛍光観察のための励起光の照射、細胞の染色などによって細胞にダメージを与える点で改善の余地があった。特に再生医療の分野では、インビトロで培養した細胞を人体に移植することが前提となるので、細胞へのダメージをできる限り抑制しつつ、細胞の三次元情報を取得することが強く要請されている。

10

【0004】

そこで、本発明は、細胞へのダメージをより抑制しつつ、細胞の三次元情報を取得するための手段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】

【0005】

一の形態の顕微鏡装置は、観察光学系と、駆動部と、撮像部と、制御部と、合焦位置演算部と、三次元情報演算部とを備える。観察光学系は、対物レンズを有し、観察対象物を観察する。駆動部は、観察対象物と観察光学系の焦点位置との相対的な位置関係を光軸方向に調整する。撮像部は、撮影画面に対応する複数の画素を有し、観察光学系を介して観察される観察対象物を撮像し、位相差画像の撮影画面の画像データを取得する。制御部は、駆動部および撮像部を制御して、観察対象物と観察光学系の焦点位置とを光軸方向に相対的に移動させつつ観察対象物を撮像させ、光軸方向の位置情報に関連付けて複数の位相差画像の画像データをメモリする。合焦位置演算部は、複数の位相差画像の画像データに基づき、撮影画面の同一位置の画素に関して光軸方向の位置関係が異なる状態で取得された複数の画素の出力信号を画像処理して、撮影画面の画素における観察光学系の合焦位置を求める。三次元情報演算部は、合焦位置演算部の出力情報に基づき、撮影画面の画素の位置情報と画素における合焦位置の情報とを求め、観察対象物の三次元情報を生成する。

20

【0006】

ここで、上記一の形態の顕微鏡装置を備える細胞培養装置や、または上記一の形態の顕微鏡装置の構成を顕微観察方法やプログラムなどに変換して表現したのも本発明の具体的な態様として有効である。

30

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】本実施形態の細胞培養装置の概要正面図

【図2】本実施形態の顕微鏡ユニットの概略構成図

【図3】本実施形態の顕微鏡ユニットでの観察動作の一例を説明する流れ図

【図4】(a) 顕微鏡画像の一例を示す図、(b) 図4(a)において細胞領域と被細胞領域との分離状態を示す図

【図5】図4(a)に示した培養細胞の輪郭表面の高さと合焦位置との関係例を示す図

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0008】

以下、図面を参照しつつ、本実施形態における細胞培養装置の構成を説明する。図1は、本実施形態の細胞培養装置の概要正面図である。

【0009】

本実施形態の細胞培養装置11は、上部ケーシング12と下部ケーシング13とを有している。図1に示す細胞培養装置11の組立状態において、上部ケーシング12は下部ケーシング13の上に載置されている。なお、上部ケーシング12と下部ケーシング13との内部空間は、ベースプレート14によって上下に仕切られている。また、細胞培養装置11の正面には、培養容器19や機材を搬出入するための扉が設けられている(図1では扉が開放された状態を示すとともに、簡単のために扉の図示は省略する)。

50

【 0 0 1 0 】

上部ケーシング 1 2 の内部には、細胞の培養を行う恒温室 1 5 が形成されている。この恒温室 1 5 は温度調整装置および湿度調整装置を有しており、恒温室 1 5 内は細胞の培養に適した環境（例えば温度 3 7 °C、湿度 9 0 % の雰囲気）に維持されている（なお、図 1 では温度調整装置および湿度調整装置の図示は省略する）。

【 0 0 1 1 】

また、恒温室 1 5 には、ストッカー 1 6、顕微鏡ユニット 1 7、容器搬送装置 1 8 が配置されている。

【 0 0 1 2 】

ストッカー 1 6 は、上部ケーシング 1 2 の正面からみて恒温室 1 5 の左側（図 1 の左側）に配置される。ストッカー 1 6 は複数の棚を有しており、ストッカー 1 6 の各々の棚には培養容器 1 9 を複数収納することができる。そして、各々の培養容器 1 9 には細胞が培地とともに収容されている。

10

【 0 0 1 3 】

顕微鏡ユニット 1 7 は、上部ケーシング 1 2 の正面からみて恒温室 1 5 の右側（図 1 の右側）に配置される。この顕微鏡ユニット 1 7 では、培養容器 1 9 内の細胞のタイムラプス観察を実行することができる。

【 0 0 1 4 】

この顕微鏡ユニット 1 7 は、上部ケーシング 1 2 のベースプレート 1 4 の開口部に嵌め込まれて設置される。顕微鏡ユニット 1 7 は、試料台 2 1 と、試料台 2 1 の上方に張り出したスタンドアーム 2 2 と、本体部 2 3 とを有している。そして、試料台 2 1 およびスタンドアーム 2 2 は恒温室 1 5 に配置される一方で、本体部 2 3 は下部ケーシング 1 3 に収納される。このような構成により、培養容器 1 9 内の細胞の観察を環境条件を変化させることなく行うことが可能となる。

20

【 0 0 1 5 】

また、試料台 2 1 は透光性の材質で構成されており、その上に培養容器 1 9 を載置することができる。この試料台 2 1 は水平方向へ移動可能に構成されており、上面に載置した培養容器 1 9 の位置を調整することができる。

【 0 0 1 6 】

容器搬送装置 1 8 は、上部ケーシング 1 2 の正面からみて恒温室 1 5 の中央に配置される。容器搬送装置 1 8 は、多関節アームを有する垂直ロボットの先端に、培養容器 1 9 を挟持するためのアームを取り付けて構成されている。これにより、容器搬送装置 1 8 は、ストッカー 1 6、試料台 2 1 との間で培養容器 1 9 の受け渡しを行うことができる。

30

【 0 0 1 7 】

次に、図 2 を参照しつつ、本実施形態の顕微鏡ユニット 1 7 の構成を説明する。顕微鏡ユニット 1 7 は、上記の試料台 2 1 と、顕微光学系（3 1 ~ 3 9）と、レンズ駆動部 2 4 と、撮像部 2 5 と、メモリ 2 6 および制御部 2 7 とを有している。ここで、レンズ駆動部 2 4、メモリ 2 6 および撮像部 2 5 は、それぞれ制御部 2 7 と接続されている。

【 0 0 1 8 】

顕微光学系は、光源 3 1 と、コレクタレンズ 3 2 と、ミラー 3 3 と、フィールドレンズ 3 4 と、リング絞り 3 5（開口絞り）と、コンデンサレンズ 3 6 と、対物レンズ 3 7 と、位相リング 3 8 と、結像レンズ 3 9 とを有している。ここで、光源 3 1、ミラー 3 3、フィールドレンズ 3 4、リング絞り 3 5、コンデンサレンズ 3 6 は、スタンドアーム 2 2 内に配置されている。また、対物レンズ 3 7、位相リング 3 8、結像レンズ 3 9 は、本体部 2 3（試料台 2 1 の下側）に配置されている。

40

【 0 0 1 9 】

図 2 において、光源 3 1 から射出される照明光は、コレクタレンズ 3 2 によって平行光となり、ミラー 3 3 によって図 2 の下方向に導かれる。そして、ミラー 3 3 で反射された照明光は、フィールドレンズ 3 4 で集光されてリング絞り 3 5 に入射する。リング絞り 3 5 は、リング状の開口を有する円板であって、照明光をリング状の絞り光とする。このリ

50

リング絞り35は、コンデンサレンズ36の前側焦点位置に配置されている。また、コンデンサレンズ36は、リング絞り35を通過した光束を集光する。これによって、試料台21に載置された培養容器19が上側から照明光で照射される。

【0020】

対物レンズ37は、培養容器19を透過した直接光(0次光)と、培養容器19内の位相物体(培養細胞)に応じて発生した回折光とを透過させる。位相リング38は、対物レンズ37の後側焦点面位置で、リング絞り35と光学的に共役な位置に配置されている。この位相リング38は、培養細胞で生じた回折光の一部を透過して、この透過光の位相に遅れ(または進み)を生じさせる。また、結像レンズ39は、上記の直接光と回折光とに基づいて、培養細胞の拡大像を撮像部25に結像させる。かかる顕微光学系では、位相リング38を透過した光と位相リング38以外を通過した光とが干渉し、結像レンズ39を介して結像面に明暗の差として結像される。これにより、培養細胞の位相差観察を行なうことができる。

10

【0021】

レンズ駆動部24は、対物レンズ37を光軸方向(図2の上下方向)に駆動させて、顕微光学系の焦点調節を行う。

【0022】

撮像部25は、顕微観察系による結像を撮像して顕微鏡画像のデータを生成する。この撮像部25は、撮像素子と、撮像素子の出力信号に対するゲイン調整およびA/D変換を行うアナログフロントエンドと、各種の画像処理を行う画像処理部とを有している。なお、図2では、撮像部25の個々の構成要素の図示は省略する。

20

【0023】

メモリ26は、例えばフラッシュメモリ等の不揮発性の記憶媒体で構成される。このメモリ26には、顕微鏡画像のデータが記憶される。また、メモリ26には、制御部27によって実行されるプログラムも記憶される。

【0024】

制御部27は、顕微鏡ユニット17の各部を統括的に制御するプロセッサである。また、制御部27は、メモリ26に格納されたプログラムの実行により、領域分離部28、合焦位置演算部29、三次元情報演算部30として機能する。なお、領域分離部28、合焦位置演算部29、三次元情報演算部30の説明についてはいずれも後述する。

30

【0025】

以下、図3の流れ図を参照しつつ、本実施形態の顕微鏡ユニット17での観察動作の一例を説明する。この動作例では、顕微鏡ユニット17が視野内の培養細胞の体積の演算を行う。なお、図3の例では、観察対象となる培養容器19が、容器搬送装置18によって試料台21の上に搬送されている状態を前提として説明を行う。なお、図4(a)に示した培養容器19内には、培養液中に付着細胞と浮遊細胞とが存在している。

【0026】

ステップS101: 制御部27は、同一の視野範囲で焦点位置の異なる複数の顕微鏡画像を撮像する。具体的には、制御部27は光源31を点灯させて培養容器19を照明するとともに、撮像部25を駆動させて顕微鏡画像を撮像する。その後、制御部27は、レンズ駆動部24によって対物レンズ37の位置を光軸方向(Z軸方向)にシフトさせてから、同じ撮影条件で顕微鏡画像の撮像を繰り返す。例えば、図4(a)の培養容器19の底面方向から上方へ座標Z1~Z5のセクショニングがされた複数の顕微鏡画像を取得する。これにより、同一の視野で焦点位置がそれぞれ異なる複数の顕微鏡画像が生成される(図4(b)参照)。ここで、S101で撮像された各顕微鏡画像のデータは、制御部27によってそれぞれメモリ26に記録される。なお、各々の顕微鏡画像のデータには、その画像を撮像したときの対物レンズ37の焦点位置を示す焦点位置情報がそれぞれ対応付けされるものとする。

40

【0027】

ステップS102: 領域分離部28は、複数の顕微鏡画像(S101)の輝度値を用い

50

て、顕微鏡画像に対応する撮影画面の画素ごとに輝度の分散値を求める。例えば、領域分離部 28 は、各顕微鏡画像の座標 (x , y) の画素が示す複数の輝度値から、撮影画面の座標 (x , y) の全ての画素においてそれぞれ輝度の分散値を演算する。

【 0 0 2 8 】

ステップ S 1 0 3 : 領域分離部 28 は、輝度の分散値 (S 1 0 2) に基づいて、培養細胞が位置する細胞領域と、培養細胞が位置しない非細胞領域とを分離する。

【 0 0 2 9 】

一例として、領域分離部 28 は、撮影画面の座標 (x , y) における輝度の分散値を領域判定用の閾値と比較する。ここで、撮影画面で培養細胞が位置する箇所では、焦点位置の変化によって画像間で輝度の変化が生じる。そのため、培養細胞が位置する箇所では、輝度の分散値は大きくなる。一方、撮影画面で培養細胞が位置しない箇所では、焦点位置が変化しても画像間で輝度の変化はほとんど生じない。そのため、培養細胞が位置する箇所では、輝度の分散値は極めて小さくなる。

10

【 0 0 3 0 】

したがって、座標 (x , y) における輝度の分散値が閾値以上であるときには、領域分離部 28 は座標 (x , y) の画素を細胞領域と判定する。一方、輝度の分散値が閾値未満であるときには、領域分離部 28 は座標 (x , y) の画素を非細胞領域と判定する。そして、領域分離部 28 は、撮影画面の各座標で上記の判定を行うことで、撮影画面における細胞領域と非細胞領域との分離を行う。なお、撮影画面で細胞領域と非細胞領域とを分離した状態を図 4 (b) に模式的に示す。

20

【 0 0 3 1 】

なお、S 1 0 3 での領域分離部 28 は、細胞領域の画素をグループ化するグループ化処理と、グループ化された各細胞領域に識別情報 (例えば識別番号など) を一対一に対応付けするラベリング処理とを行う。

【 0 0 3 2 】

ステップ S 1 0 4 : また、領域分離部 28 は、非細胞領域 (S 1 0 3) における輝度値を用いて輝度閾値を設定する。一例として、領域分離部 28 は、複数の顕微鏡画像 (S 1 0 1) のうちから任意のフレームを選択する。そして、領域分離部 28 は、選択したフレームにおける非細胞領域の各画素の輝度値を平均して、上記の輝度閾値を求める。なお、S 1 0 4 で求めた輝度閾値は、細胞領域の各画素での合焦位置を求めるときに合焦位置演算部 29 によって使用される。

30

【 0 0 3 3 】

ステップ S 1 0 5 : 合焦位置演算部 29 は、撮影画面の細胞領域 (S 1 0 3) における各画素での合焦位置をそれぞれ求める。この合焦位置が細胞の輪郭を示すことになる。すなわち、位相差画像 (顕微鏡画像) を用いた場合、位相差の輝度は、位相変化の大きい部位ほど大きくなるという特性がある。そのため、一般的に細胞の輪郭部位が輝度値最大となる。一例として、S 1 0 5 での合焦位置演算部 29 は、以下の (1) から (3) の処理を実行する。

【 0 0 3 4 】

(1) 合焦位置演算部 29 は、撮影画面の細胞領域のうちから、処理対象となる注目画素を選択する。そして、合焦位置演算部 29 は、各々の顕微鏡画像のデータ (S 1 0 1) から上記の注目画素に対応する輝度値をそれぞれ取得する。

40

【 0 0 3 5 】

(2) 合焦位置演算部 29 は、上記 (1) で取得した各輝度値と輝度閾値 (S 1 0 4) とを比較する。ここで、位相差による輝度変化が明方向に現れる画素では、対物レンズ 37 が合焦位置にあるときに相対的な輝度値が最も大きくなる。一方、位相差による輝度変化が暗方向に現れる画素では、対物レンズ 37 が合焦位置にあるときに相対的に輝度値が最も小さくなる。

【 0 0 3 6 】

よって、上記 (1) で取得した各輝度値が輝度閾値以上となる場合には、合焦位置演算

50

部 2 9 は以下の処理を行う。この場合、合焦位置演算部 2 9 は、上記 (1) で取得した輝度値を用いて、空間方向における輝度値の最大点を求める。そして、合焦位置演算部 2 9 は、上記の最大点を示す顕微鏡画像を取得できる対物レンズ 3 7 の焦点位置を、注目画素での合焦位置と判定する。これにより、位相差による輝度変化が明方向に現れる画素での合焦位置を求めることができる。

【 0 0 3 7 】

一方、上記 (1) で取得した各輝度値が輝度閾値未満となる場合には、合焦位置演算部 2 9 は以下の処理を行う。この場合、合焦位置演算部 2 9 は、上記 (1) で取得した輝度値を用いて、空間方向における輝度値の最小点を求める。そして、合焦位置演算部 2 9 は、上記の最小点を示す顕微鏡画像を取得できる対物レンズ 3 7 の焦点位置を、注目画素での合焦位置と判定する。これにより、位相差による輝度変化が暗方向に現れる画素での合焦位置を求めることができる。

10

【 0 0 3 8 】

なお、この (2) において、合焦位置演算部 2 9 は、注目画素の位置で輝度値が最大 (または最小) となる顕微鏡画像を抽出するとともに、抽出された顕微鏡画像に対応する対物レンズ 3 7 の焦点位置を合焦位置としてもよい。あるいは、合焦位置演算部 2 9 は、注目画素の位置における各輝度値を補間する補間曲線を求めるとともに、この補間曲線上での最大点 (または最小点) に基づいて対物レンズ 3 7 の合焦位置を演算で求めてもよい。

【 0 0 3 9 】

(3) 合焦位置演算部 2 9 は、処理対象となる注目画素を別の画素に変更して上記 (2) の処理を繰り返し、細胞領域の各画素における対物レンズ 3 7 の合焦位置をそれぞれ求める。そして、合焦位置演算部 2 9 は、撮影画面の細胞領域の各画素について対物レンズ 3 7 の合焦位置を示す合焦位置マップを生成する。

20

【 0 0 4 0 】

ステップ S 1 0 6 : 三次元情報演算部 3 0 は、対物レンズ 3 7 の合焦位置に基づいて培養細胞の輪郭表面の高さ (光軸方向における培養細胞の輪郭表面の位置) を求める。すなわち、三次元情報演算部 3 0 は、公知の光学の基礎式 (レンズのガウスの式) を用いて、各画素での対物レンズ 3 7 の合焦位置 (S 1 0 5) から、その画素の位置に対応する培養細胞の輪郭表面の高さを求める。これにより、三次元情報演算部 3 0 は、培養細胞の輪郭表面の高さを示す三次元的な距離画像のデータ (点群データ) を得ることができる。なお、図 4 の例において培養細胞の輪郭表面の高さと合焦位置との関係を図 5 に示す。

30

【 0 0 4 1 】

ステップ S 1 0 7 : 三次元情報演算部 3 0 は、培養細胞の輪郭表面の高さ (S 1 0 6) に基づいて、S 1 0 2 でグループ化された各細胞領域が浮遊細胞および付着細胞のいずれの種類に属するかを判定する。

【 0 0 4 2 】

具体的には、まず、三次元情報演算部 3 0 は培養容器 1 9 の底面位置を取得する。例えば、三次元情報演算部 3 0 は、撮影画面内のすべての細胞領域において、輪郭表面の高さが最も低い位置にあるものを培養容器 1 9 の底面位置とみなす (図 5 参照) 。上記条件に該当する輪郭表面の位置は、培養容器 1 9 の底面に付着した付着細胞の外縁に対応すると考えられるからである。

40

【 0 0 4 3 】

そして、三次元情報演算部 3 0 は、細胞領域のグループのうちで、輪郭表面の高さが培養容器 1 9 の底面位置から一定距離 (閾値 h) 以上離れているものを浮遊細胞と判定する (図 5 参照) 。これにより、三次元情報演算部 3 0 は、撮影画面内の浮遊細胞および付着細胞を自動的に識別することが可能となる。

【 0 0 4 4 】

ステップ S 1 0 8 : 三次元情報演算部 3 0 は、撮影画面内に含まれる付着細胞の総体積を推定する。具体的には、まず、三次元情報演算部 3 0 は、撮影画面の細胞領域のうちで S 1 0 7 で浮遊細胞と判定されたものを処理対象から除外する。次に、三次元情報演算部

50

30は、対物レンズ37の倍率を考慮して単位画素の面積を求める。そして、三次元情報演算部30は、処理対象となった細胞領域(付着細胞)に含まれる各画素の高さ(S106)を積分することで個々の培養細胞の体積をそれぞれ推定する。その後、三次元情報演算部30は、撮影画面内に含まれる付着細胞の総体積のデータを生成してメモリ26に記録する。以上で、図3の流れ図の説明を終了する。

【0045】

以下、本実施形態の作用効果を説明する。本実施形態の顕微鏡ユニット17は、焦点位置の異なる複数の位相差観察画像を用いて細胞領域における画素の合焦位置をそれぞれ求め、この合焦位置に基づいて培養細胞の三次元形状を取得する。したがって、本実施形態の顕微鏡ユニット17では、励起光の照射や染色によるダメージを細胞に与えることなく、培養細胞の三次元情報を取得することができる。しかも、本実施形態の顕微鏡ユニット17は、恒温室15内で培養細胞の観察を行うため、観察時の環境条件の変化によって培養細胞にダメージを与えることもない。

10

【0046】

また、本実施形態の顕微鏡ユニット17は、複数の位相差観察画像を用いて、撮影画面内の細胞領域を予め絞り込んだ上で培養細胞の三次元情報を求める。これにより、本実施形態の顕微鏡ユニット17では、培養細胞の三次元情報を求めるときの演算負荷を軽減することができる。

【0047】

さらに、本実施形態の顕微鏡ユニット17は、培養細胞の三次元情報に基づいて、浮遊細胞と付着細胞との識別や培養細胞の体積の推定を行うことができ、細胞培養装置11の機能性を一層高めることが可能となる。

20

【0048】

特に、本実施形態の細胞培養装置11によって図3に示す一連の処理を伴うタイムラプス観察を実行した場合には、付着細胞の総体積の時間的な推移を示す増殖曲線(growth curve)を取得することができる。これにより、本実施形態の細胞培養装置11では、例えば積層した細胞についても、よりの確な観察や培養状態の評価を行うことが可能となる。

【0049】

(実施形態の補足事項)

(1)上記実施形態の領域分離部28は、分散値を用いずに、輝度値のみで領域分離を行ってもよい。なお、上記実施形態のように領域分離部28が分散値を用いて領域分離を行う場合には、コントラストが強くなり、領域分離を行いやすくなるというメリットがある。

30

【0050】

(2)上記実施形態における顕微鏡ユニット17は、光源側の焦点面および像側焦点面に複屈折光学部材を有し、光波の干渉によって試料の位相差を輝度差に変換して結像させる微分干渉顕微鏡であってもよい(なお、微分干渉顕微鏡の光学系は公知であるので、詳細な説明および図示は省略する)。

【0051】

(3)上記実施形態における顕微鏡ユニット17の動作はあくまで一例であって、図3に示す処理を適宜組み替えて実施してもかまわない。一例として、顕微鏡ユニット17は、上記S107の動作を省略して、撮影画面内に含まれる全ての細胞の体積を求めるようにしてもよい。あるいは、顕微鏡ユニット17は、浮遊細胞と付着細胞との識別処理のみを行うようにしてもよい。すなわち、顕微鏡ユニット17は、S107の動作後にS108での処理を実行せずに一連の処理を終了してもよい。

40

【0052】

(4)上記実施形態における顕微鏡ユニット17の構成はあくまで一例にすぎない。例えば、本発明の顕微鏡ユニット17は、試料台21の下側に光源31が配置される一方で、培養容器19の上側に対物レンズ37等が配置されるものであってもよい。さらに、本発明の顕微鏡装置は恒温室15内に配置されるものに限定されず、恒温室15外で使用さ

50

れる顕微鏡装置も当然に本発明の技術的範囲に含まれる。

【0053】

(5) 上記実施形態の顕微鏡ユニット17において、対物レンズ37の代わりに試料台21の位置を光軸方向に駆動させて焦点調節を行うようにしてもよい。

【0054】

(6) 培養細胞の体積を求めるアルゴリズムは上記実施形態の例に限定されることはない。一例として、三次元情報演算部30は、細胞領域の面積を矩形や円などの他の形状に近似し、細胞領域の任意位置の高さ(あるいは細胞領域内の平均高さ)を乗じてグループ化された個々の培養細胞の体積を近似的に演算してもよい。

【0055】

(7) 上記実施形態では、領域分離部28、合焦位置演算部29、三次元情報演算部30の各機能をプログラムによってソフトウェア的に実現する例を説明したが、これらの構成をASICを用いてハードウェア的に実現しても勿論かまわない。

【0056】

(8) なお、上記実施形態でメモリ26に記憶されているプログラムは、バージョンアップなどで更新されるファームウェアプログラムであってもよい。すなわち、既存の顕微鏡装置のファームウェアプログラムを更新することで、本発明の顕微鏡装置の機能を提供するようにしてもよい。

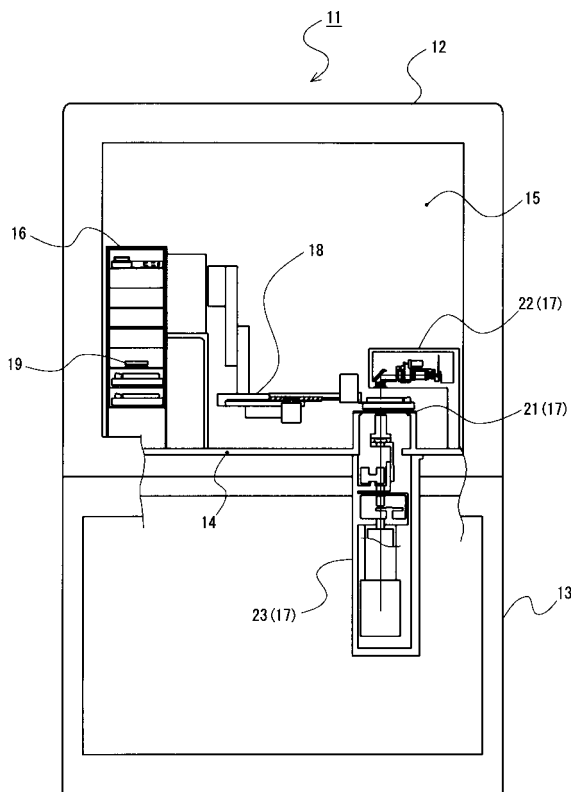
【0057】

なお、本発明は、その精神またはその主要な特徴から逸脱することなく他の様々な形で実施することができる。そのため、上述した実施形態はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。本発明は、特許請求の範囲によって示されるものであって、本発明は明細書本文にはなんら拘束されない。さらに、特許請求の範囲の均等範囲に属する変形や変更は、全て本発明の範囲内である。

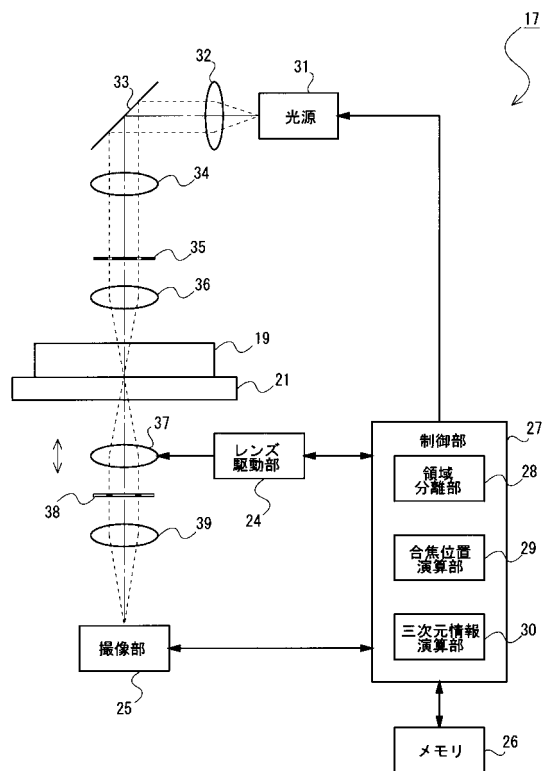
10

20

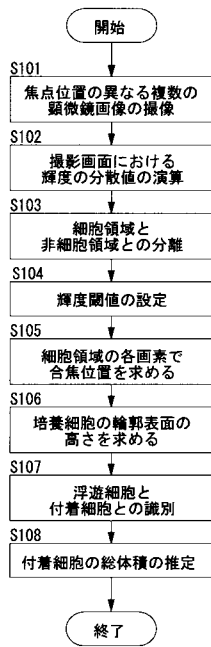
【図1】



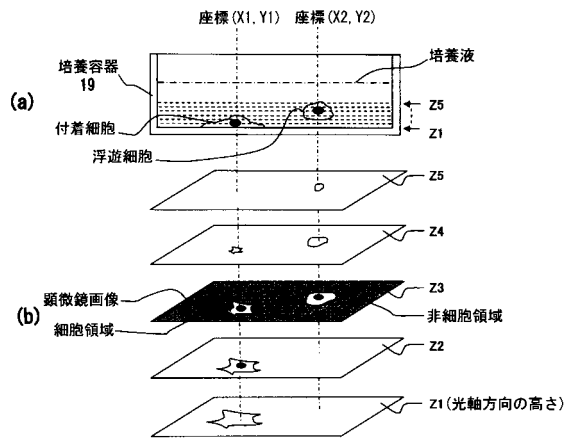
【図2】



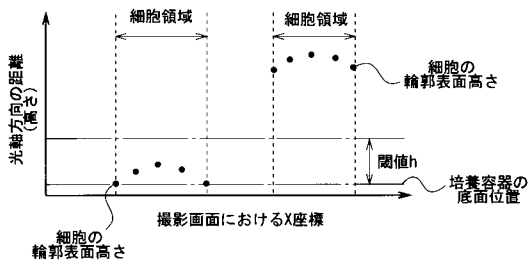
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平08 - 294035 (JP, A)
特開平06 - 004601 (JP, A)
特開昭63 - 066465 (JP, A)
特開2003 - 501693 (JP, A)
特開2001 - 281550 (JP, A)
特開2005 - 055879 (JP, A)
特開2003 - 029151 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G02B 19/00 - 21/00
G02B 21/06 - 21/36