

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-105703

(P2019-105703A)

(43) 公開日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>GO2B 21/00 (2006.01)</b>	GO2B 21/00	2H052
<b>GO2B 21/36 (2006.01)</b>	GO2B 21/36	
<b>GO2B 21/14 (2006.01)</b>	GO2B 21/14	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2017-237319 (P2017-237319)  
 (22) 出願日 平成29年12月12日 (2017.12.12)

特許法第30条第2項適用申請有り 2017年7月30日掲載、<http://www.riat.co.jp>、<http://www.riat.co.jp/index02.html>、<http://www.riat.co.jp/products04.html>

(71) 出願人 304033720  
 有限会社 高度技術研究所  
 茨城県ひたちなか市東石川3543番地2  
 (74) 代理人 110001922  
 特許業務法人 日牽国際特許事務所  
 (72) 発明者 清水 勲  
 茨城県ひたちなか市東石川3543番地2  
 有限会社高度技術研究所内  
 (72) 発明者 野口 雅之  
 茨城県つくば市竹園1-3-8-322  
 Fターム(参考) 2H052 AA03 AA04 AC05 AC10 AC34  
 AD34 AF14 AF25

(54) 【発明の名称】 位相差画像検査装置及び位相差画像検査方法

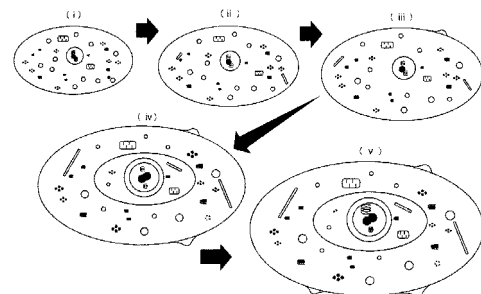
(57) 【要約】

【課題】位相差顕微鏡をがん細胞など生体細胞の非染色実時間検査用顕微干涉計として用いて、従来の検査装置と比較してその機能の細部観察上の優位性を生かし、「機能的診断法」の有効な支援手段を提供する。

【解決手段】取り込まれた散乱回折光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得する。

【選択図】 図6

図 6



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡による生体細胞の観測方法において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観変化現象(A)及び細胞内構造変化現象(B)になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得すること

を特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡による生体細胞の観測方法。

**【請求項 2】**

均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての变化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得すること

を特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法。

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載されたレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法において、試料ががん生体細胞であって、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から変化現象で特定されたがん細胞の種類を同定することを特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法。

**【請求項 4】**

均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観変化現象(A)及び細胞内構造変化現象(B)になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得すること

を特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡。

10

20

30

40

50

**【請求項 5】**

均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回折光の高次光までも取り込み、散乱回折光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置において、

試料が生体細胞であって、

当該レーザ位相差画像取得顕微鏡が、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回折光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回折光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、

生体細胞観測手段が、

当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得すること

を特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載されたレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置において、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から細胞の種類を同定することを特徴とするレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、生体細胞の核やガラス板中の微小欠陥、気泡など微細な位相物体の通常の顕微鏡では殆ど見えない微細な位相差を明確に可視化し、位相物体の形状や、物質中の異物、歪、屈折率変化や、マイクロクラックなどの微細な異常部分を、大視野で画像抽出して、検査をすることを可能にしたり、内部に核を持つ位相物体である細胞の形状別自動識別を可能にしたりするなど、透明物体の位相差を用いて被検査物体の種類の識別を行う検査方法および装置に関する。

**【背景技術】****【0002】**

従来、生体細胞など透明な粒子状位相物体の観測や計測は、位相差顕微鏡[非特許文献1]を使って行われてきた。しかし、従来の位相差顕微鏡では、照射光にリング絞りを入れて集光レンズで絞って狭い視野をつくり、試料の後に置かれた対物レンズの後焦点面にリング状の位相板を置いて観察するという複雑な光学系が用いられた。

**【0003】**

また、従来の位相差顕微鏡は、光源にコヒーレンシ(可干渉性)のある光源が使われている訳ではなく、光源からの光の波連の位相が空間的にも時間的にも揃っていない。したがって、光波の干渉縞は空間的にも時間的にも変動するために、生体細胞中にある核などのような位相差物体の干渉画像が必ずしも鮮明ではないという欠点があった。

**【0004】**

なお、光源にレーザを使う位相差顕微鏡[特許文献1]であって、照射光の波連が空間的にも時間的にも揃っている光源を持つ位相差顕微鏡であっても、画像を鮮明にしよとしてリング状の照明を用いている位相差顕微鏡[特許文献1]では、従来の位相差顕微鏡と同じく視野が狭く浅く、多数の微細な対象を広い視界中で同時に観察することは困難であっ

10

20

30

40

50

た。

【 0 0 0 5 】

また、従来の位相差顕微鏡に比べて、測定視界に大幅な自由度を確保するために位相差コンデンサ部の位相リングを除去しようとする試み〔特許文献 2〕があったが、最終的には、画像を鮮明にするためにリング状の照明を用いているから、真の意味での広くて深い測定視界を持つ位相差顕微鏡は見当たらず、これまで開発されてきた何れの位相差顕微鏡でも、その視野が狭く浅く、多数の微細な対象を広い視界中で同時に観察することは困難であった。

【 0 0 0 6 】

更にまた、従来の位相差顕微鏡では、位相差を含めた異なる形状の複数形状粒子群を同一形状ごとに同時にその数や挙動を自動的に計測するという機能は持っていなかった。

10

【 0 0 0 7 】

本願特許出願人は、このような問題を解決する発明について特許出願をして、特許第 5733940 号〔特許文献 3〕を取得した。

【 0 0 0 8 】

また、本願特許出願人は、このような問題を解決する発明について特許出願をした。特許文献 4 は、当該本件特許出願になるものである。

【 0 0 0 9 】

特許文献 5 には、細胞の遺伝子の複数世代にわたって解析可能な細胞画像解析装置が開示されている。

20

【 0 0 1 0 】

特許文献 6 には、位相差顕微鏡を用いて位相差画像を取得し、位相差画像に対して二次微分フィルタを用いてエッジを抽出し、当該エッジを持つ浮遊細胞の形状に基づいて当該浮遊細胞の活性状態を判定することが記載される。

【 0 0 1 1 】

特許文献 7 には、全焦点画像を原画像として生成する全焦点画像生成部を有して、当該原画像から細胞に出現する神経突起を抽出し、当該神経突起の状態を判定することが記載される。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

30

【 0 0 1 2 】

【 特許文献 1 】 特許第 3 4 5 5 1 9 4 号公報

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 3 - 1 9 5 1 8 0 号公報

【 特許文献 3 】 特許第 5 7 3 3 9 4 0 号公報

【 特許文献 4 】 特開 2 0 1 7 - 1 2 9 7 6 0 号公報

【 特許文献 5 】 特開 2 0 1 2 - 3 9 9 2 7 号公報

【 特許文献 6 】 特開 2 0 0 8 - 2 1 2 0 1 7 号公報

【 特許文献 7 】 特許第 6 0 1 5 1 1 3 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 1 3 】

40

【 非特許文献 1 】 「応用工学 1」、3 - 8 - 2 位相差法、( 1 9 9 0 . 7 出版 ) 培風館 鶴田匡夫著

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 4 】

特許文献 3 には、レーザ光源、可干渉性拡大平行レーザ光束を形成するレーザ光拡大平行光構成光学系、可干渉性平行レーザ光束中に設置されたフーリエ変換レンズ、該フーリエ変換レンズの前側に設けられた物体導入手段、該フーリエ変換レンズの後焦点面に設けられてフーリエ変換像の光回折パターンを通す位相フィルタ、前記フーリエ変換レンズの後焦点面を前焦点面として設置され、位相フィルタを通過した高次の回折光および零次光

50

を集光する逆フーリエ変換レンズ、および該逆フーリエ変換レンズの集光面に結像された光学像を撮影するために設置された電子カメラ、のそれぞれが光軸上に設置されて、から構成される、物体導入手段から投写される導入物体の位相差物体干渉像を形成する位相差画像作成光学系を備え、

該位相差画像作成光学系は、前記フーリエ変換レンズが可干渉性拡大平行レーザ光束中に設置されて、前記フーリエ変換レンズの前焦点面導入物体の画像を前記逆フーリエ変換レンズの後焦点面に結像させる該後焦点面の位置に、前記フーリエ変換レンズの前焦点面上の光軸上および光軸から直角方向に外方に外れた位置の導入物体の位相差顕微鏡を広い視野で撮り込むこと

を特徴とする位相差画像表示装置が記載されている。

10

#### 【0015】

本発明者は、透明な試料を染色せずに観察することのできる有用な技術である位相差顕微鏡を開発して、従来型の位相差顕微鏡の欠点である、(1)像の輪郭がぼやけること、(2)試料にない後光のような模様が出る現象(halo effect)を解決して、従来型の位相差顕微鏡に比べて広い視野、深い被写界深度も持つ位相画像を撮り込むことが出来た。

#### 【0016】

従来型の位相差顕微鏡には、上述した2つの課題の他に、(3)異なる透過度に合わせたコントラストを最適化が出来ないという解決すべき技術課題がある。特許公報に記載された技術には、第3の技術課題についての解決方法が提示されていない。

#### 【0017】

本願になる発明者は、特許文献3に記載された光学系を保持して、上述した三つの技術課題を同時に解決することを内容とする特許出願を行い、当該特許出願は、特許文献7として公開された。

20

#### 【0018】

当該位相差顕微鏡ががん細胞など生体細胞の非染色実時間検査用顕微干渉計として用いられるとき、従来の検査装置と比較してその機能の細部観察上の優位性が明らかとなってきたことで、「機能的診断法」の有効な支援手段としてなり得ることが分かった。

#### 【0019】

本発明は、かかる点に鑑み当該位相差顕微鏡を生体細胞、特にがん細胞などの増殖性細胞観測の非染色実時間検査用顕微干渉計として用いて、従来の検査装置と比較してその機能の細部観察上の優位性を生かし、「機能的診断法」の実施に際して有効な支援手段を提供することを課題とする。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0020】

課題解決のため、均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回折光の高次光までも取り込み、散乱回折光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡が用いられる。

#### 【0021】

より具体的には、レーザ光源、可干渉性拡大平行レーザ光束を形成するレーザ光拡大平行光構成光学系、可干渉性平行レーザ光束中に設置されたフーリエ変換レンズ手段、該フーリエ変換レンズの前側に設けられた物体導入手段、該フーリエ変換レンズの後焦点面に設けられてフーリエ変換像の光回折パターンの零次光を直線偏光に変え、高次回折光を円偏光に変えて透過させる位相フィルタ手段、前記フーリエ変換レンズ手段の後焦点面を前焦点面として設置され、位相フィルタを通過した高次の回折光および零次光を集光する逆フーリエ変換レンズ手段、該フーリエ変換レンズ手段の前または後ろに設置された偏光板、および該逆フーリエ変換レンズ手段の集光面に結像された光学像を撮影するために設置された電子カメラ、のそれぞれが光軸上に設置されて構成され、偏光板によって強度差が調整された前記透過した零次光直線偏光と前記高次回折光円偏光とで、物体導入手段から投写される導入物体の位相差物体干渉像を形成する位相差画像作成光学系を備え、

40

50

該位相差画像作成光学系は、前記フーリエ変換レンズ手段が可干渉性拡大平行レーザ光束中に設置されて、前記フーリエ変換レンズ手段の前焦点面導入物体の画像を前記逆フーリエ変換レンズ手段の後焦点面に結像させる該後焦点面の位置に、前記フーリエ変換レンズ手段の前焦点面上の光軸上および光軸から直角方向に外方に外れた位置の導入物体についての、強度差が調整された前記透過した零次光直線偏光と前記高次円偏光によって形成された位相差物体干渉像を広い視野で撮り込むことを特徴とする位相差画像検査装置が用いられ得る。

#### 【0022】

上述された位相差画像検査装置は、可干渉性拡大平行レーザ光束を形成するレーザ光拡大平行光構成光学系の前に回転可能な  $\lambda/2$  板（フィルタ）を備える

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡による生体細胞の観測方法は、均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡による生体細胞の観測方法において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観変化現象（A）及び細胞内構造変化現象（B）になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得すること

を特徴としている。

#### 【0023】

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法は、均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状（A1）及び細胞サイズ（A2）を含む細胞外観変化現象（A）と、細胞内形状（B1）及び細胞内小器官サイズ（B2）を含む細胞内構造変化現象（B）と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得すること

を特徴としている。

#### 【0024】

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法は、上述されたレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法において、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状（A1）及び細胞サイズ（A2）を含む細胞外観変化現象（A）と、細胞内形状（B1）及び細胞内小器官サイズ（B2）を含む細胞内構造変化現象（B）と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から細胞の種類を同定することを特徴としている。

#### 【0025】

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡は、均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光

10

20

30

40

50

と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡において、

試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観変化現象(A)及び細胞内構造変化現象(B)になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得すること

を特徴としている。

10

#### 【0026】

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置は、均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射し、微細画像情報を含む散乱回析光の高次光までも取り込み、散乱回析光の内、高次光と零次光とを光学フィルタで干渉させて試料の微細部分の観測データを取得し、画像化された干渉画像を取得することが可能なレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置において、

試料が生体細胞であって、

当該レーザ位相差画像取得顕微鏡が、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み、

20

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、

生体細胞観測手段が、

当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得すること

を特徴としている。

30

#### 【0027】

本発明のレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置は、上述されたレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置において、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から細胞の種類を同定することを特徴としている。

#### 【発明の効果】

#### 【0028】

レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いることで、

(1) 広い領域を持つ回析光を高次光まで取り込むことで高次光による微細画像再構成で輪郭明確化が実現される。

40

(2) フィルタ手段に零次光透過光透過手段を設けることにより、試料透過の零次光が自己干渉を起こすことを防ぎ、零次光干渉の効果による後光効果(halo effect)を防ぐことが出来る。

(3) 偏光板の角度調整により、零次光を減衰させ、バックグラウンド光を弱めることで、散乱光強度を相対的に強め、零次光のバックグラウンド光と高次散乱光との干渉を強め、画像のコントラストを強めることが出来る。

#### 【0029】

このように、(1)像の輪郭がぼやけること、(2)試料にない後光のような模様が出る現象(halo effect)を解決して、従来型の位相差顕微鏡に比べて広い視野、深い被写

50

界深度も持つ位相画像を撮り込むことが出来、更に(3)異なる透過度に合わせたコントラストの最適化を実現することが出来る。

【0030】

このような状況下、本発明によれば、レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法によって、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、核内形状(C1)及び核内小器官サイズ(C2)を含む核内構造変化現象(C)からなる変化現象を取得することができる。

【0031】

このように、本発明によれば、当該位相差顕微鏡をがん細胞など生体細胞の非染色実時間検査用顕微干渉計として用いて、従来の検査装置と比較してその機能の細部観察上の優位性を生かし、「機能的診断法」の有効な支援手段を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】本発明の実施例に用いる位相差画像表示装置の概略構成を示す図

【図2】図1に示された図の内の最上の図を拡大して示す図

【図3】引用文献3に記載された位相差画像表示装置の概略構成を示す図

【図4】本発明の実施例に用いる位相差画像検査装置及び引用文献3に記載された位相差画像検査装置によって取得されたガラス破片の顕微鏡画像の比較を示す図

【図5】変化現象に基づいて画像化された干渉画像200を模式的に示す図

【図6】変化現象からなる観測データを時々刻々に取得する状況を示す図

【図7】変化の前後の変化分を時々刻々の干渉画像として取得して表示した例を示す図

【図8】観察した肺がん細胞の全体視野画像を示す図

【図9】図8の全体視野画像が時々刻々に変化する状況を取り出して示した図

【図10】がん細胞形状変化と細胞核形状変化を捉えた観測データから表示された画像を示す図

【図11】図10の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図

【図12】がん細胞形状変化と細胞核の形状・核内小器官の変化を捉えた観測データから表示された画像を示す図

【図13】図12の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図

【図14】がん細胞形状変化と細胞核の形状・小器官変化を捉えた観測データから表示された画像を示す図

【図15】図14の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図

【発明を実施するための形態】

【0033】

以下、本発明の実施例になるレーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置を説明する。

【0034】

レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞観測装置を説明する前に、当該レーザ位相差画像取得顕微鏡を説明する。

【0035】

当該レーザ位相差画像取得顕微鏡は、フーリエ変換像の光回折パターンの零次光を直線偏光に変え、高次回折光を円偏光に変えて透過させる位相フィルタ手段、例えばフーリエ変換面の中央に零次光透過の穴を開けた  $\lambda/4$  板 ( $\lambda/2$  フィルタ) を置き、カメラの前方に偏光板を置くことで、 $\lambda/4$  板で試料からの零次透過光と  $\lambda/4$  板透過の高次回折光とに位相差を生じさせ、偏光板で零次透過光(零次直線偏光)と高次回折透過光(高次円偏光)との強度差を生じさせて、偏光板を、例えば任意に回転させることによって角度を調節して画像のコントラストを任意に変えることを可能にし、相対的に高次回折透過光の強度を強めることで調節して、それらの干渉を強めると共に高次回折透過光の微細画像作

10

20

30

40

50

像の寄与度を高めて、広い視野で撮り込んだ試料の輪郭や内部核などの輪郭を明確に画像化することを特徴とする。

【0036】

図1に、当該レーザ位相差画像取得顕微鏡の持つ位相差画像表示装置100の全体概略を示す。図2は、図1のimage plane位置での拡大図である。拡大図についての詳細説明は、図中に記載した。

【0037】

図3は、図1に示した位相差画像表示装置100を容易に理解できるように対比して提示した特許文献3に記載された位相差画像表示装置100Aを示した。

【0038】

図1に示した位相差画像検査装置100（位相差画像表示装置ともいえる）100及び図3に示した位相差画像検査装置100A共、レーザ光源1から照射された可干渉性光はレンズ2,3を通して平行光束として照射される。可干渉性平行光束中に置かれたフーリエ変換レンズ（フーリエ変換レンズ手段、以下同じ）7の前側あるいはフーリエ変換レンズ7の前焦点面付近に設置された物体導入手段6に被検査物体を入れれば、そのフーリエ変換像（光回折パターン）はフーリエ変換レンズ7の後焦点面に形成される。

【0039】

図3の位相差画像検査装置100Aにあつては、該フーリエ変換像の零次光を、位相板（ $\lambda/4$ 板）20を通し光強度調整の減光フィルタを通して、フーリエ変換レンズ7の後焦点面を前焦点面として設置された逆フーリエ変換レンズ9を通せば、逆フーリエ変換した物体光と位相変換して減光し平行光とされた零次参照光とが逆フーリエ変換レンズ9の集光面で位相差物体の干渉像が電子カメラ10で撮像される。

【0040】

図3に示される技術は、可干渉性平行レーザ光を検査物体の照射光として使ったために、検査法は極めて単純になり、従来法のように、照射光のリング絞りと集光レンズの後焦点面のリング状の位相板の位置合わせに労力を要しない。また、本技術では、フーリエ変換レンズの後焦点面に位相板と減光フィルタを置くだけで、フーリエ変換像の零次光は確実に位相画像の参照光になって、位相物体の位相差が光強度画像情報に変えられるから、本技術は、位相画像の単純化効果を持つ。

【0041】

図1に示される位相差画像検査装置100にあつても、位相板（ $\lambda/4$ 板）20、逆フーリエ変換レンズ9及び電子カメラ10を備え、上述した効果を達成する。位相差画像検査装置100は、位相板（ $\lambda/4$ 板）20と偏光板23とをペアフィルタ（pair filter）として構成している。この構成によって、当該実施例は、位相画像の鮮明化という効果を達成する。更に、回転可能な $\lambda/2$ 板（フィルタ）21を組み合わせている。通常、円偏光と直線偏光は干渉せず、偏光板があつてはじめて同じ偏光面の光波が干渉する。この構成によって、当該実施例は、位相画像の更なる鮮明化という効果を達成する。なお、高次光の他の偏光面を持つ円偏光は物体の細部情報の明確化に寄与する。

【0042】

図1において、位相差画像検査装置100は、レーザ光源1、回転可能な $\lambda/2$ 板（フィルタ）21、可干渉性拡大平行レーザ光束を形成するレーザ光拡大平行光構成光学系、可干渉性平行レーザ光束中に設置されたフーリエ変換レンズ7、このフーリエ変換レンズ7の前側に設けられた物体導入手段6、このフーリエ変換レンズ7の後焦点面に設けられてフーリエ変換像の光回折パターンの零次光だけを通す穴22を中央に備え高次回折光を円偏光に変えて透過させる $\lambda/4$ 板（ $\lambda/2$ フィルタ）位相フィルタ20、前記フーリエ変換レンズ7の後焦点面を前焦点面として設置され、位相フィルタ20を通過した高次の回折光および零次光を集光する逆フーリエ変換レンズ9、このフーリエ変換レンズ7の前または後ろに設置された回転可能な偏光板23、および該逆フーリエ変換レンズ9の集光面に結像された光学像を撮影するために設置された電子カメラのそれぞれが光軸上に設置され構成される、物体導入手段6から投写される導入物体の位相差物体干渉像を形成する位相差

10

20

30

40

50

画像作成光学系を備える。

【0043】

この位相差画像作成光学系は、フーリエ変換レンズ7が可干渉性拡大平行レーザ光束中に設置されて、フーリエ変換レンズ7の前焦点面導入物体の画像を前記逆フーリエ変換レンズ9の後焦点面に結像させる後焦点面の位置に、フーリエ変換レンズ7の前焦点面上の光軸上および光軸から直角方向に外側に外れた位置の導入物体の位相差像を電子カメラ10に広い視野で撮り込むことが出来る。

／4板（／2フィルタ）位相フィルタ20は、典型的にフーリエ変換レンズ7の後焦点面に設けられてフーリエ変換像の光回折パターンの零次光を通す穴22を中央に備え高次回折光を円偏光に変えて透過させる。穴22を減光フィルタで塞いで零次光を減光させることはできるが、減光フィルタの強度を連続的に変えて、零次光の強度を任意に変えるために穴とすることがよい。したがって、本実施例における穴とは、物理的な穴ばかりでなく、零次光を通すことに何の障害もない手段をも意味している。

【0044】

フーリエ変換レンズ7の前または後に設置された偏光板23が、光軸上に設置され、強度差が調整された前記透過した零次光と前記高次回折光とで、物体導入手段から投写される導入物体の位相差物体干渉像を形成する。零次光と高次光との強度比を連続的に変えられる。

【0045】

前記フーリエ変換レンズ7の前焦点面導入物体の画像を前記逆フーリエ変換レンズ9の後焦点面に結像させる該後焦点面の位置に、前記フーリエ変換レンズ7の前焦点面上の光軸上および光軸から直角方向に外方に外れた位置の導入物体についての、強度差が調整された前記透過した零次光と前記高次回折光によって形成された位相差物体干渉像を広い視野で撮り込む。

【0046】

上述したように、可干渉性拡大平行レーザ光束を形成するレーザ光拡大平行光構成光学系のレーザ光源1の後ろに回転可能な／2板（フィルタ）21を備える。回転することで角度が調節される。レーザ光源1の後ろに置いた／2板21は直線偏光しているレーザ光の偏光面を変える（直線偏光の偏光面の角度が変わる）働きをする。／2板が無くても本発明の特徴は得られるが、／2板21を配設することによって偏光依存性を持つ試料を観測する場合に効果的な働きを得ることが出来る。

【0047】

上述したように、偏光板23は、回転可能であり、回転することで角度が調節される。

【0048】

穴あき／4板の設置位置は、前記フーリエ変換レンズ7の後焦点面であり、偏光板23の配置位置は、穴あき／4板の後で逆フーリエ変換レンズ9の前でも後ろでもよい。

【0049】

特許文献3に記載された技術では、零次光を／4板を通過させ減光フィルタで減光させることで散乱光との干渉を図ることに対し、本実施例では広い領域を持つ／4板中央に零次光透過の穴22を開け、カメラ10の前方に偏光板23を置くことにより特許文献3に記載された技術とは逆に散乱高次光を／4板を通過させ、偏光板23通過で減光した零次光と干渉させる。

【0050】

／2板（フィルタ）21は、フィルタによる偏光面を形成し、／2板（フィルタ）21の回転によって照射光又は零次光（赤色表示）、及び高次回折光（青色表示）を、偏光面方向に偏光させる。

【0051】

試料を通った零次直線偏光と高次回折円偏光とが形成される。

【0052】

／2フィルタを透過した高次回折円偏光（青色表示）と零次直線偏光（赤色表示）は

10

20

30

40

50

、図に示す形態となる。

【0053】

今、偏光板23の角度が図に示される位置（黒色表示）に調整されたとする。

【0054】

図に、穴あき / 4板20と角度調節可能な偏光板23とからなるフィルタ対を透過した透過光の形態状態が黒、赤及び青色3色で表示される。偏光板23の作用によって、偏光板の偏光透過面（図で黒色表示）の方向と円偏光の高次光（青色表示）の同方向偏光透過光の強さがベクトルで示されるようになり、高次回折光の微細画像作像の寄与度が高められる。

【0055】

ここで、 / 4板通過の散乱高次光は円偏光になり、偏光板での減衰が少ないことから、偏光板23を零次光の口径にあわせ微細加工する必要がないという簡便さの利点を得られる。

【0056】

穴あき / 4板20と角度調節可能な偏光板23とからなるフィルタ対を用いることで、次のような利点を得られる。

(1) 広い / 4板で回折光を高次光まで取り込むことにより高次光による微細画像再構成で輪郭明確化が実現される。

(2) / 4板中央に零次光透過穴を開けることにより、試料透過の零次光が自己干渉を起こすことを防ぎ、従来型に生ずる零次光干渉の効果による、後光効果（halo effect）を防ぐことができる。

(3) 偏光板の角度調整により、零次光を減衰させ、バックグラウンド光を弱めることで、散乱光強度を相対的に強め、零次光のバックグラウンド光と高次散乱光との干渉を強め、画像のコントラストを強め、検査体の輪郭ばかりでなく内部構造までも明確な画像とすることができる。

【0057】

図4は、位相差画像検査装置100（図4（a））及び引用文献3に記載された位相差画像検査装置100Aによって取得されたガラス破片の顕微鏡画像（図4（b））の比較を示す図である。

【0058】

本実施例によって取得された画像はガラス破片の傾斜部の厚さ情報が図に示されるように内部が等高線になって現れ、位相差情報が引用文献3に記載された位相差画像検査装置によって取得されたガラス破片の顕微鏡画像に比べて輪郭ばかりでなく内部まで明確に現われる。

【0059】

また、透明物体の微細な情報が細部に亘って明確になり、取得画像は引用文献3に記載された位相差画像検査装置によって取得されたガラス破片の顕微鏡画像と質的に異なることが示されている。

【0060】

図1、図2において、2の / 2板（フィルタ）の代わりに / 4板（ / 2フィルタ）とし、穴あき / 4板（ / 2フィルタ）の代わりにガラス板の中央に貼った零次光だけが通る大きさの円形 / 4板とした位相フィルタの組み合わせによっても、上述した効果と同等の効果を生じさせることができる。この組み合わせフィルタでも、高次回折光は円偏光となり、零次光は直線偏光となるので、カメラの前に設置された偏光板23によって、同等の効果が生ずる。すなわち、零次光を直線偏光とする零次光の直線偏光化フィルタ手段及び高次回折光を円偏光とする高次回折光円偏光化フィルタ手段を設ける。

【0061】

本実施例は、ポリスチレンラテックス20.3 μm、10.3 μm及び5.0 μm標準粒子群についても適用して粒子画像の縁が引用文献3に記載された位相差画像検査装置によって取得された顕微鏡画像に比べて明確に現われた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

以上に示したように、複数形状の同時並列実時間識別が可能とされる。

## 【 0 0 6 3 】

レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いた生体細胞の観測方法において、  
試料が生体細胞であって、

当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザ光を試料に照射して画像を形成し、画像に表示された内の細胞を特定し、特定した細胞についての散乱回析光の高次光までも取り込み

取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状 (A1) 及び細胞サイズ (A2) を含む細胞外観変化現象 (A) と、細胞内形状 (B1) 及び細胞内小器官サイズ (B2) を含む細胞内構造変化現象 (B) と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得する。

10

## 【 0 0 6 4 】

当該レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いることで、取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観形状 (A1) 及び細胞サイズ (A2) を含む細胞外観変化現象 (A) と、細胞内形状 (B1) 及び細胞内小器官サイズ (B2) を含む細胞内構造変化現象 (B) と、になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得できることが分かった。

20

## 【 0 0 6 5 】

図 5 は、変化現象に基づいて画像化された干渉画像 2 0 0 を模式的に示す図である。

## 【 0 0 6 6 】

図 5 において、変化現象は、当該細胞の細胞外観形状 (A1) 及び細胞サイズ (A2) を含む細胞外観変化現象 (A) と、細胞内形状 (B1) 及び細胞内小器官サイズ (B2) を含む細胞内構造変化現象 (B) と、になる変化現象からなる。

## 【 0 0 6 7 】

図 5 において、細胞外観形状 (A1) として、新突起発生  
細胞サイズ (A2) として、細胞サイズ変化  
細胞内形状 (B1) として、新膜発生、新核内膜発生、新小器官発生、  
細胞内小器官減、核内小器官形状変化  
細胞内小器官サイズ (B2) として、小器官サイズ変化、核内小器官サイズ変化

30

が示される。当該レーザ位相差画像取得顕微鏡を用いることで、細胞外観変化現象 (A) と細胞内構造変化現象 (B) とを組み合わせたこれらの変化現象を観察することができる。

## 【 0 0 6 8 】

図 6 は、取り込まれた散乱回析光の内、高次光と零次光とをフィルタで、継続して干渉させ、時々刻々に変化する当該細胞の細胞外観変化現象 (A) 及び細胞内構造変化現象 (B) になる変化現象からなる観測データを時々刻々に取得する状況を示す図である。

40

図 6 (i) から (v) に示されるように当該細胞の細胞外観及び細胞内構造は、時々刻々に変化する。このように変化する変化現象が、細胞外観形状 (A1) 及び細胞サイズ (A2) を含む細胞外観変化現象 (A) と、細胞内形状 (B1) 及び細胞内小器官サイズ (B2) を含む細胞内構造変化現象 (B) として観測され、観測データとして取得される。取得された観測データは、レーザ位相差画像取得顕微鏡に付随して設けられたコンピュータ、例えばパソコンに送信され、その画像装置の画面に直ちに撮像された干渉画像として表示される。

## 【 0 0 6 9 】

その画像装置の画面に直ちに撮像された干渉画像として表示する場合に、観測者のニーズに従って干渉画像の内的一部分を画像削除手段を用いて削除することで、画面に表示するこ

50

とができる。変化現象からなる観測データを時々刻々に取得し、当該組み合わせになるいずれかの変化現象もしくは全ての変化現象に基づいて画像化された時々刻々の干渉画像を取得することができる。

【0070】

図7は、細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)の時々刻々に変化する現象について、変化の前後の変化分を時々刻々の干渉画像として取得して表示した例を示す。これらの例では、上図に、新器官発生と小器官サイズ変化が抽出されて表示された。下図に、細胞外観形状変化としての新突起発生が抽出され、表示された。これらの変化が双方あった場合には、これらの変化が組み合わされて画面に表示される。

10

【0071】

時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から細胞の種類を同定することが可能になる。

【0072】

試料ががん生体細胞である場合、時々刻々の干渉画像の時間的に前後の干渉画像の比較による当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)と、になる変化現象を取得し、当該変化現象から変化現象で特定された、細胞増殖が激しいがん細胞の種類を同定することに寄与できる。

20

【0073】

当該細胞の細胞外観形状(A1)及び細胞サイズ(A2)を含む細胞外観変化現象(A)と、細胞内形状(B1)及び細胞内小器官サイズ(B2)を含む細胞内構造変化現象(B)二に分けたが、細胞内構造変化現象(B)を細分化して、細胞内構造変化現象と核内構造変化現象とに分けることができる。

【0074】

図8～図15は、観察した肺がん細胞の変化状況を捉えた画像である。試料が肺がんの生体細胞である。試料が肺がんの生体細胞に特定されず、特に増殖性細胞の詳細な観測が必要とされる試料について効果があるが、以下、試料を肺がんの生体細胞に特定して説明する。

30

【0075】

図8は、観察した肺がん細胞の全体視野画像を示す。

【0076】

図9は、図8の全体視野画像が時々刻々に変化する状況を取り出して示した図である。

【0077】

図10は、がん細胞形状変化と細胞核形状変化を捉えた観測データから表示された画像を示す。

【0078】

図11は、図10の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図である。

40

【0079】

図12は、がん細胞形状変化と細胞核の形状・核内小器官の変化を捉えた観測データから表示された画像を示す。

【0080】

図13は、図12の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図である。

【0081】

図14は、全体視野画像の中で特定され、切り出された画像領域内に存在する複数の細胞の内の他方の細胞について、がん細胞形状変化と細胞核の形状・小器官変化を捉えた観

50

測データから表示された画像を示す。

【0082】

図15は、図14の観測データが時々刻々に変化する状況を取り出して示した図である。

【0083】

よって、図8を見る時には、図9を参照する手法で、二つの図をペアでみることを勧められる。以下、同様である。また、図8の画像を取得したときに、図9に示される画像が画像加工ソフトウェアによって容易に取得される。

【0084】

図8、図9において、当該細胞に均一強度で平行な干渉性レーザー光が試料である肺がん生体細胞に照射されて全体視野画像が形成され、画像に表示された複数の細胞の内、いくつかの細胞を含む領域が特定され、観測領域とされた。観測領域が図面上に枠で示される。

【0085】

図10、図11において、画面に、がん細胞形状変化と細胞核形状変化を捉えた干渉画像が表示された。左上に、模式的にこれらの変化状況を示した。これらの画面から分かるように、一つの画面上に、細胞外観変化現象(A)として、がん細胞形状変化ばかりでなく、細胞サイズに変化が表示され、さらに細胞内構造変化現象(B)として、細胞核形状変化干渉画像が表示された。

【0086】

図12、図13において、画面に、がん細胞形状変化と細胞核の形状・核内小器官の変化を捉えた干渉画像が表示された。左上に、模式的にこれらの変化状況を示した。これらの画面から分かるように、一つの画面上に、細胞外観変化現象(A)として、がん細胞形状変化ばかりでなく、細胞サイズが増大した状況を示す変化が表示され、さらに細胞内構造変化現象(B)として、細胞核の形状・核内小器官変化干渉画像が表示された。

【0087】

図14、図15において、画面に、他方の細胞について、がん細胞形状変化と細胞核の形状・核内小器官の変化を捉えた干渉画像が表示された。左上に、模式的にこれらの変化状況を示した。これらの画面から分かるように、一つの画面上に、他方の細胞について、細胞外観変化現象(A)として、がん細胞形状変化ばかりでなく、細胞サイズに変化が表示され、さらに細胞内構造変化現象(B)として、細胞核の形状・核内小器官変化干渉画像が表示された。図11に示されるように、一つの画面上に、複数の細胞について、細胞外観変化現象(A)として、がん細胞形状変化ばかりでなく、細胞サイズに変化が表示され、さらに細胞内構造変化現象(B)として、細胞核の形状・核内小器官変化干渉画像を表示することができる。広い領域で細胞内部まで一度に観察することの出来る干渉画像が提供される。

【0088】

これらの画像から分かるように、本実施例によれば、前処理を要さず、検体組織中の癌細胞の活発な動きを実時間で時々刻々に画像検査することが可能とされ、初期段階のがん疾患を迅速・明確に診断するための支援画面が提供される。この支援画面は、非染色実時間の時々刻々検査を可能とさせ、機能的な診断を可能とさせる。がん細胞採取のその場での判定を可能とし、判定に要する時間は、数分から1時間もあれば十分であり、短時間診断に寄与することになる。

【0089】

本実施例の実施に際して、生体細胞を染色や薄切理などの加工を要せず、細胞、細胞核、細胞内小器官の実時間の時々刻々の動きからこれら細胞の観測画像を取得でき、特に増殖によって動きの激しいがん細胞の観測画像を取得できる。このように、本発明によれば、当該位相差顕微鏡をがん細胞など生体細胞の非染色実時間検査用顕微干渉計として用いて、従来の検査装置と比較してその機能の細部観察上の優位性を生かし、「機能的診断法」の有効な支援手段を提供することができる。

10

20

30

40

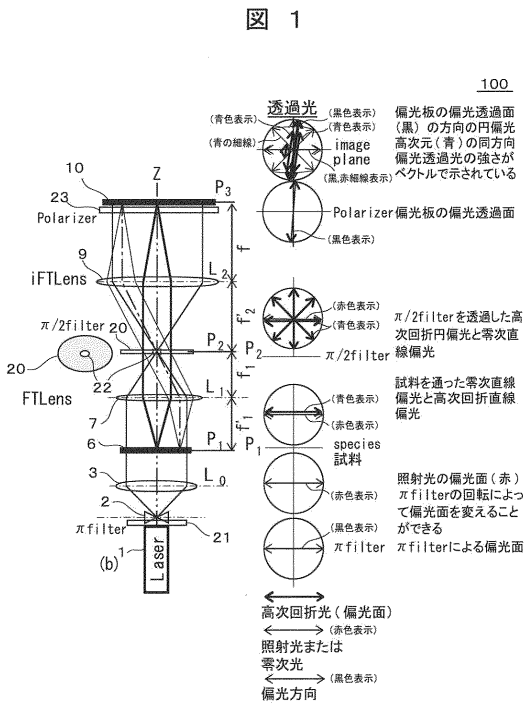
50

【符号の説明】

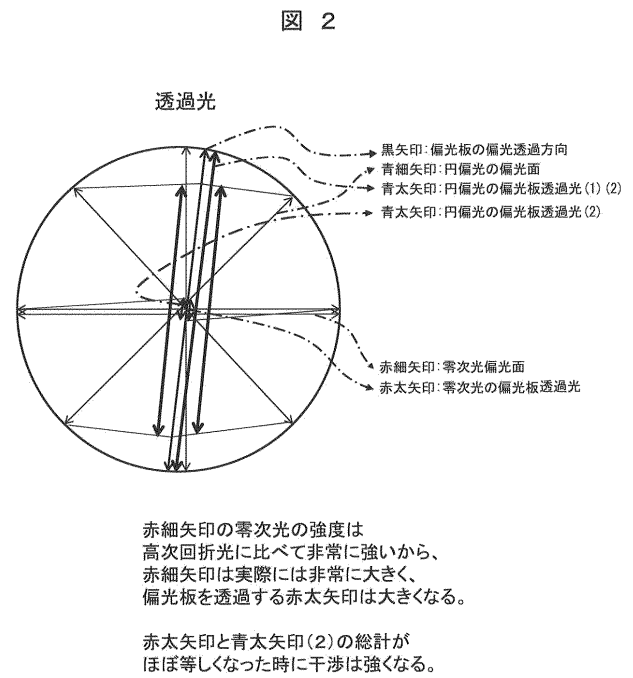
【0090】

- 1 : 光源 (レーザー)
- 2 : レンズ
- 3 : レンズ
- 6 : 物体導入手段
- 7 : フーリエ変換レンズ
- 9 : 逆フーリエ変換レンズ
- 10 : 電子カメラまたはCCDカメラ
- 20 : /4板 ( /2フィルタ) 位相フィルタ (位相フィルタ手段)
- 21 : /2板 (フィルタ)
- 22 : 穴
- 23 : 偏光板

【図1】

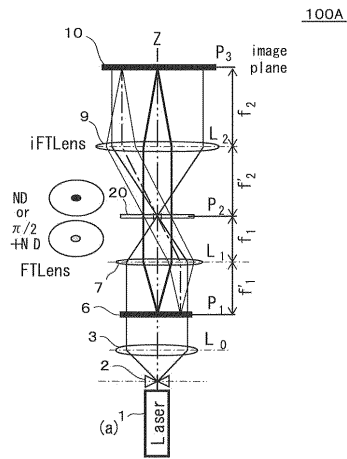


【図2】



【 図 3 】

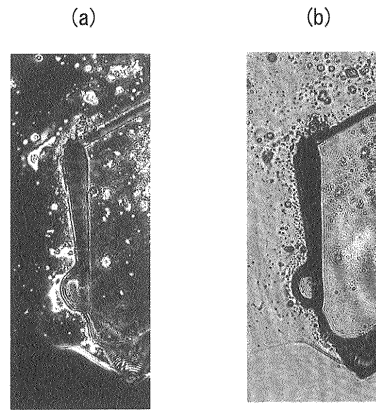
図 3



【 図 4 】

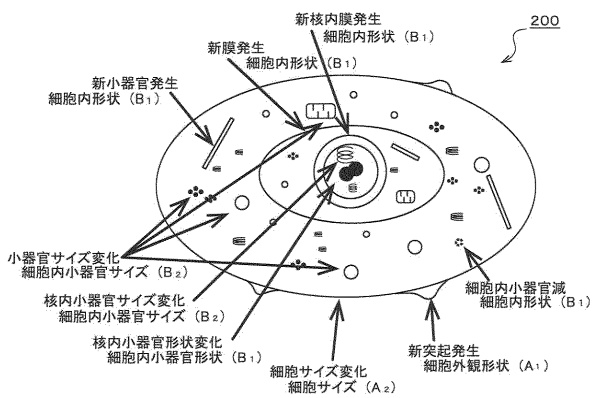
図 4

ガラス破片の顕微鏡画像の比較



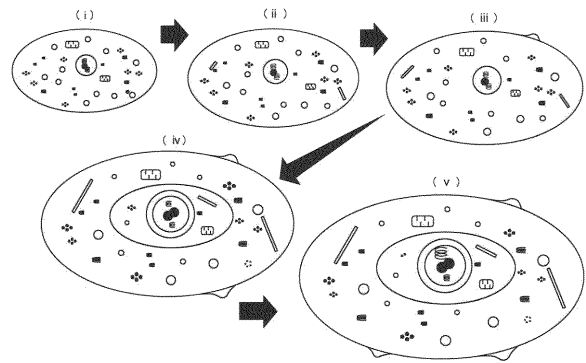
【 図 5 】

図 5

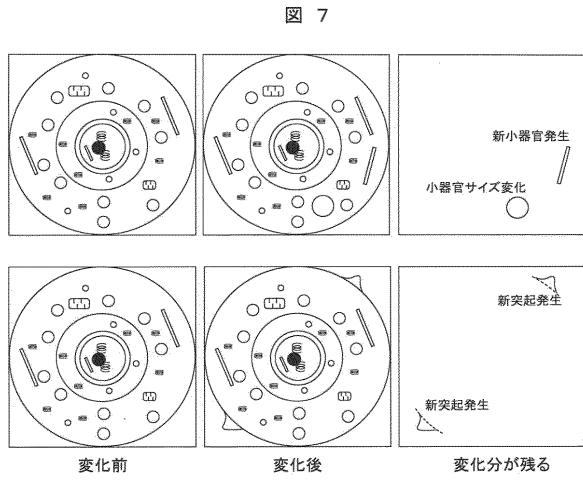


【 図 6 】

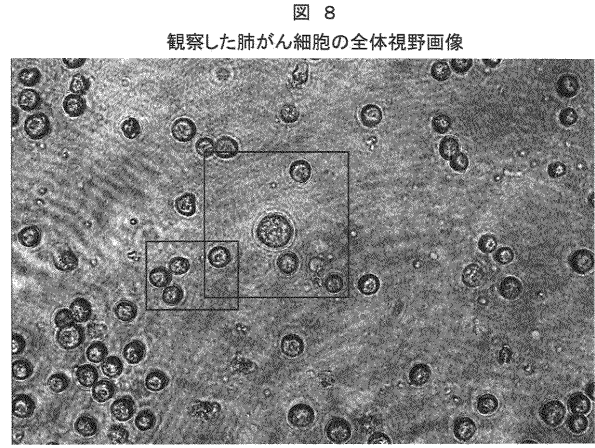
図 6



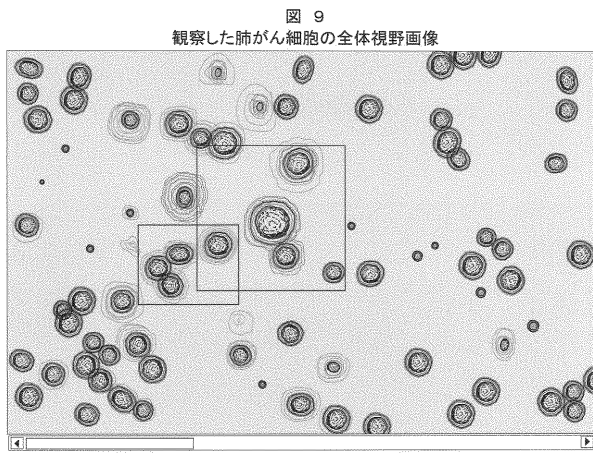
【 図 7 】



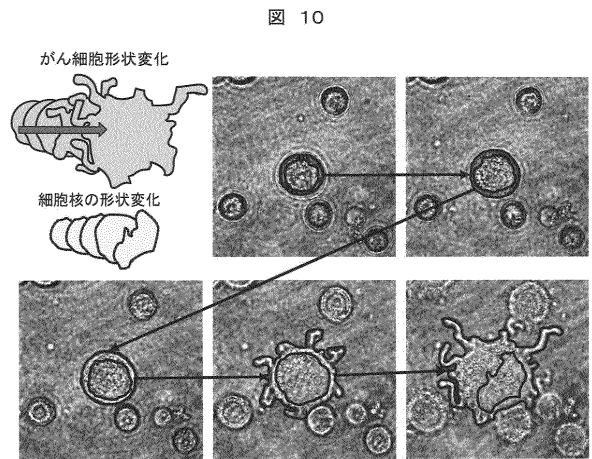
【 図 8 】



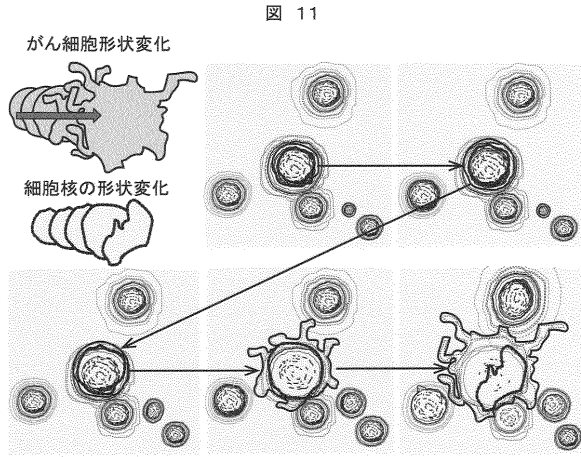
【 図 9 】



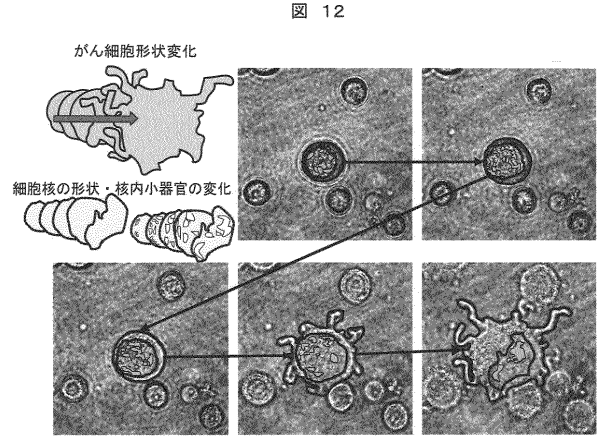
【 図 10 】



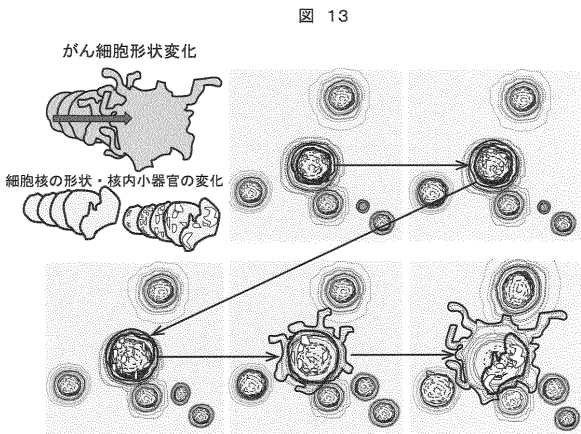
【 図 1 1 】



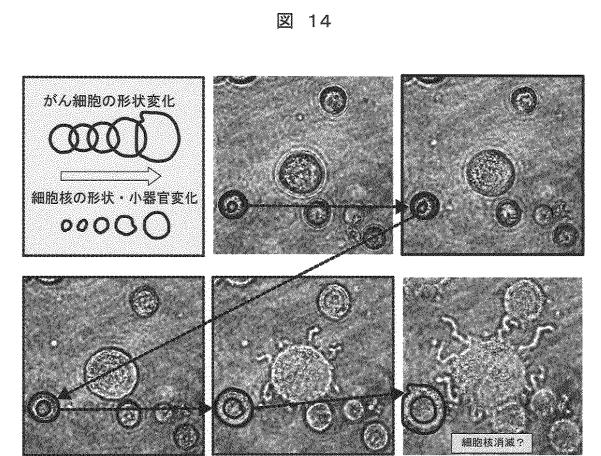
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 15 】

図 15

