

(43) 国際公開日
2007 年 12 月 21 日 (21.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/145091 A1

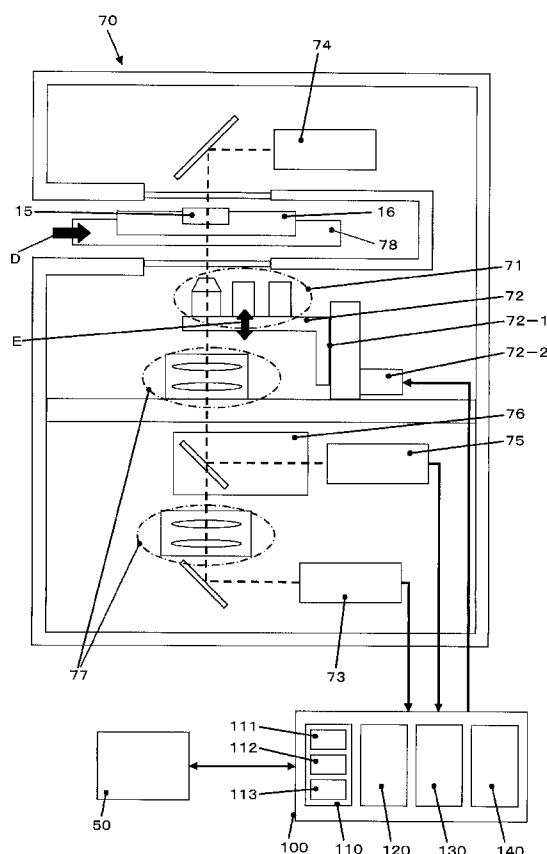
- (51) 国際特許分類:
C12M 3/00 (2006.01) G02B 21/00 (2006.01)
G02B 7/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/061223
- (22) 国際出願日: 2007 年 6 月 1 日 (01.06.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2006-165898 2006 年 6 月 15 日 (15.06.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニコン (NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 清田 泰次郎 (KIY-OTA, Yasujiro) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 魚

- 住 孝之 (UOZUMI, Takayuki) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 鎌田 久男 (KAMATA, Hisao); 〒1700013 東京都豊島区東池袋 1-25-9 タカセビル別館 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: CELL INCUBATOR

(54) 発明の名称: 細胞培養装置



(57) Abstract: A cell incubator enabling creation of a superimposition image by capturing an image of cells and a fluorescence image and superimpose the cell image on the fluorescence image with high accuracy. A cell incubator (10) having an observation section (70) for observing the cultivation process of cells comprises a focus detecting section (110) for detecting the focal position of an imaging optical system (71) of the observing section (70), an optimum focus judging section (120) for capturing images while moving stepwise by a small movement distance an imaging optical system (71) from the detected focus position along the optical axis and judging the optimum best focus position on the basis of the images, and a fluorescence observing section (130) for capturing a fluorescence image of the cells by moving the imaging optical system (71) to the detected optimum best focus position.

(57) 要約: 細胞の画像及び蛍光画像を撮影し、精度よく両者の重ね合わせ画像を作成することができる細胞培養装置を提供する。細胞の培養経過を観察する観察部 70 を有した細胞培養装置 10 において、前記観察部 70 の撮影光学系 71 の焦点位置を検出する焦点検出部 110 と、焦点検出部 110 により検出された焦点位置に基づいて、焦点位置から光軸方向に撮影光学系 71 を微小移動量ずつステップ移動させて複数の画像を撮影し、それらの画像に基づいて、最適な合焦点位置を判別する最適焦点判別部 120 と、最適焦点判別部 120 により検出された最適な合焦点位置に、撮影光学系 71 を移動して、細胞の蛍光画像を撮影する蛍光観察部 130 とを備える。



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

細胞培養装置

技術分野

[0001] 本発明は、細胞を培養し、観察することができる細胞培養装置に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、所定の雰囲気に維持される恒温槽内に、細胞を培養させる収納部と、細胞の培養経過を観察する観察部を備えた細胞培養装置が提案されている(例えば、特許文献1)。

特許文献1の細胞培養装置は、細胞の核やミトコンドリアなどの微細な各器官の詳細を観察する場合には、最適な合焦点位置を検出するのに多大な時間を要していた。また、蛍光観察で撮影する蛍光画像が観察しようとする各器官に対応して鮮明に、精度よく観察することができない問題があった。さらに、従来の蛍光観察においては、励起光を照射し、細胞からの蛍光に基づき焦点調節を行っていたため、焦点調節中に蛍光の褪色や、励起光により細胞がダメージを受ける弊害があった。

特許文献1:特開2004-180675号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] 本発明の課題は、細胞の画像及び蛍光画像を迅速に撮影でき、両者の画像を対応付けて精度よく観察することができる細胞培養装置を提供することである。

課題を解決するための手段

[0004] 本発明は、以下のような解決手段により、前記課題を解決する。なお、理解を容易にするために、本発明の実施形態に対応する符号を括弧内に付して説明するが、これに限定されるものではない。

請求項1の発明は、細胞の培養経過を観察する観察部(70)を有した細胞培養装置(10)において、前記観察部(70)の撮影光学系(71)の焦点位置を検出する焦点検出部(110)と、前記焦点検出部(110)により検出された前記焦点位置に基づいて

、前記焦点位置から光軸方向に前記撮影光学系(71)を微小移動量ずつステップ移動させて複数の画像を撮影し、それらの画像に基づいて、最適な合焦点位置を判別する最適焦点判別部(120)と、前記最適焦点判別部(120)により検出された前記最適な合焦点位置に、前記撮影光学系(71)を移動して、前記細胞の蛍光画像を撮影する蛍光観察部(130)とを備える細胞培養装置(10)である。

[0005] 請求項2の発明は、請求項1に記載の細胞培養装置(10)において、前記焦点検出部(110)は、前記撮影光学系(71)の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部(111)と、前記広域検出部(111)の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部(111)で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部(112)と、前記限定検出部(112)の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部(112)で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部(113)とを備えることを特徴とする細胞培養装置(10)である。

[0006] 請求項3の発明は、請求項1又は請求項2に記載の細胞培養装置(10)において、前記焦点検出部(110)は、前記撮影光学系(71)をステップ状又は連続的に移動させて焦点位置を検出し、前記最適焦点判別部(120)は、前記焦点検出部(110)の前記ステップ状又は連続の移動量よりも小さい移動量で前記撮影光学系(71)を移動させることを特徴とする細胞培養装置(10)である。

[0007] 請求項4の発明は、請求項1から請求項3までのいずれか1項に記載の細胞培養装置(10)において、前記最適な合焦点位置の前記画像と、前記蛍光観察部(130)により撮影した前記蛍光画像とを重ね合わせて重ね合わせ画像を作成する画像処理部(140)を備えることを特徴とする細胞培養装置(10)である。

[0008] 請求項5の発明は、細胞の培養状態を観察する観察部(70)を有する細胞培養装置(10)において、前記観察部(70)の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部(111)と、前記広域検出部(111)の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部(111)

)で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部(112)と、前記限定検出部(112)の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部(112)で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部(113)と、前記詳細検出部(113)で検出された合焦点位置を含み、前記光軸方向に所定の焦点検出領域を設定し、この所定の焦点検出領域内を前記観察部(70)の光学系(71)を移動させながら複数枚の画像を取得する画像取得手段(120)とを備えることを特徴とする細胞培養装置(10)である。

[0009] 請求項6の発明は、細胞培養容器(15)を載置するステージと、前記細胞培養容器(15)内の細胞の培養状態を観察する観察部(70)と、前記ステージ及び前記観察部(70)を相対移動させる移動手段(78)とを有する細胞培養装置(10)において、前記観察部(70)の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部(111)と、前記広域検出部(111)の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部(111)で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部(112)と、前記限定検出部(112)の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部(112)で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部(113)と、前記詳細検出部(113)で検出された合焦点位置を含み、前記光軸方向に所定の焦点検出領域を設定し、この所定の焦点検出領域内を前記観察部(70)の光学系(71)を移動させながら複数枚の前記細胞の画像を取得する画像取得手段(120)と、前記移動手段(78)を制御して前記細胞培養容器(15)内において異なる観察ポイントに移動させ、移動後の前記観察ポイントにおいて前記画像取得手段(120)により前記細胞の画像を取得させる際に、移動前の観察ポイントの前記広域検出部(111)の合焦点位置、又は、移動前の観察ポイントの前記限定検出部(112)の合焦点位置を用いて、次の処理を実行するよう前記限定検出部(112)、前記詳細検出部(113)及び前記画像取得手段(120)を制御する制御手段(100)とを備えることを特徴とする細胞培養装置(10)である。

発明の効果

- [0010] 以上説明したように、本発明による細胞培養装置は、撮影光学系の合焦点位置を検出する焦点検出部と、合焦点位置に基づいて最適な合焦点位置を判別する最適焦点判別部と、撮影光学系を最適な合焦点位置に移動させて蛍光観察を行う蛍光観察部とを備えているので、最適な合焦点位置を迅速に検出して、細胞の蛍光画像を鮮明に、精度よく観察することができる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]本発明による実施形態の細胞培養装置を示す図である。
[図2]本発明による実施形態の観察部の詳細を示す図である。
[図3]本発明による実施形態の観察部により撮影された観察画像の一例を示す図である。
[図4]本発明による実施形態の細胞培養装置の使用方法的を示すフローチャートである。
[図5]本発明による実施形態の対物レンズ部の検出開始位置を説明する図である。

符号の説明

- [0012] 10:細胞培養装置、70:観察部、71:対物レンズ部、75:蛍光照明部、76:蛍光フィルター部、110:焦点検出部、120:最適焦点判別部、130:蛍光観察部

発明を実施するための形態

- [0013] 本発明は、細胞の画像及び蛍光画像を迅速に撮影でき、両者の画像を対応付けて精度よく観察することができる細胞培養装置を提供するという目的を、位相差観察で細胞を観察し、その観察像に基づき焦点検出を行い、合焦点位置を求め、その後、より狭い範囲をスキャンして画像情報を取得し、最適な合焦点位置を得て、その最適な合焦点位置において蛍光画像を取得することにより実現する。

以下、図面等を参照して、本発明の実施形態をあげて、さらに詳しく説明する。

図1は、本発明による実施形態の細胞培養装置を示す図である。なお、図1(A)は、細胞培養装置の外観図であり、図1(B)は、恒温槽内の詳細及び制御部の接続を示す図である。図2は、細胞培養装置の観察部の詳細を示す図である。図3は、観察

部により撮影された観察画像の一例を示す図である。なお、図3(A)は、位相差画像を示す図であり、図3(B)は、蛍光画像を示す図であり、図3(C)は、位相差画像及び蛍光画像の重ね合わせ画像を示す図である。

- [0014] 細胞培養装置10は、図1に示すように、恒温槽11、開閉扉12、搬出入部13、情報記憶部20、情報表示部30、操作入力部40、制御部50を備え、恒温槽11の内部に収納部60、観察部70及び搬送部80を備えた、複数の細胞を培養させて、その経過を自動的に観察することができる装置である。

恒温槽11は、温度37℃、湿度97%、CO₂濃度5%の雰囲気中に一定に保たれたチャンバーである。

開閉扉12は、恒温槽11の正面の全面に設けられた扉であり、恒温槽11内に配置される収納部60、観察部70及び搬送部80のメンテナンスを実施するときなどに開閉される。また、開閉扉12上には、搬出入部13、情報表示部30及び操作入力部40が配置されており、使用者の操作性を向上させている。

- [0015] 搬出入部13は、細胞を恒温槽11に搬出及び搬入させるための搬出入口である。細胞の搬出入がないときは、恒温槽11内の雰囲気を維持するために搬出入扉14により閉じられている。

搬出入扉14は、恒温槽11の内側に開閉を制限するロック機構を有した扉である。

細胞培養容器15は、細胞を培養させる容器であり、例えば、ディッシュ、ウェルプレート、フラスコなどである。

ホルダ16は、細胞培養装置10内の収納部60、観察部70及び搬送部80の各部に、細胞培養容器15を適正に配置させるための保持部材である。

- [0016] 情報記憶部20は、図1(B)に示すように、細胞の情報や、観察部70で観察した細胞の観察結果などの情報を保存するメモリである。なお、細胞の情報は、主に、細胞の細胞種、培地組成情報、初期細胞数、培地交換頻度及び継代期間などの細胞固有情報であり、また、それと関連した細胞培養容器15の種類、細胞を管理する細胞管理者情報、細胞培養の実験情報(実験名)及び細胞の培養履歴の情報なども含んでいる。

情報表示部30は、情報記憶部20に記憶された情報や、細胞培養装置10の操作

関連の情報などを表示するディスプレイであり、使用者の視認性をよくするために、図1(A)に示すように、傾斜機構32により情報表示部30を傾斜させることができる(矢印A)。

[0017] 表示形態変化部31は、細胞個々の情報の時間経過を、色の変化で簡易的に表現する表示制御部である。

操作入力部40は、細胞の情報を入力したり、情報表示部30に表示された内容に応じて、細胞培養装置10の操作内容を決定し、制御部50に操作指示を入力したりする入力装置であり、複数のボタンから構成される。

制御部50は、恒温槽11内の雰囲気を一環境に制御し、操作入力部40の操作内容に応じて、観察制御部100と、恒温槽11内の観察部70及び搬送部80とを統合して制御する制御回路である。

[0018] 使用者特定部51は、制御部50に設けられ、使用者にユーザIDを入力させることにより、細胞培養装置10のログインの可否を判断する確認回路である。使用者が予め設定したパスワードを適正に入力しない限り、細胞培養装置10は操作できないように管理されており、第三者による勝手な操作を防止している。また、ユーザIDは、収納された細胞の細胞管理者情報との関連付けがされており、複数人の使用者が登録されている場合に、登録された他人の細胞を誤って操作しないように、情報記憶部20の細胞を管理している細胞管理者情報とユーザIDとが一致した細胞に対してのみ、操作が行なえるように制限している。

収納部60は、その内部が複数の収納区画61に分割され、個々の収納区画61に、細胞の入った細胞培養容器15を、ホルダ16を介して収納し、培養させる領域である。本実施形態では、鉛直方向に9段、水平方向に3列、合計27の収納区画61が設けられている。

[0019] 観察部70は、図2に示すように、対物レンズ部71、Z軸機構部72、CCDカメラ部73、LED照明部74、蛍光照明部75、蛍光フィルタ部76、レンズ群77及びXYステージ部78を備えた細胞を観察(撮影)する顕微鏡であり、細胞の位相差観察だけでなく、核やミトコンドリアなどの細胞の各器官の状態を観察する蛍光観察(分子観察)も行うことができる。

対物レンズ部71は、細胞の種類や観察範囲の広さなどにより、選択的に使い分ける複数の対物レンズから構成されている。

Z軸機構部72は、ガイド機構72-1及び駆動モータ72-2を備え、対物レンズ部71を鉛直方向(Z軸方向)に微細に移動させて、焦点を調節する駆動機構である。

[0020] CCDカメラ部73は、細胞培養容器15にある細胞の、通常の観察画像(位相差画像)及び蛍光観察の画像(蛍光画像)を撮影するカメラである。

LED照明部74は、細胞培養容器15の細胞を照明するLEDを用いた照明であり、CCDカメラ部73の露光時間に同期させて画像撮影用の照明を発光し、また、焦点検出時におけるZ軸機構部72の移動に伴い、断続的に発光する。

蛍光照明部75は、細胞の器官を観察するために、細胞の蛍光性たんぱくを発現させる励起光を発する照明である。

蛍光フィルタ部76は、蛍光照明部75の励起光を光軸方向全体に照射して、励起光により発現した細胞の蛍光性たんぱくの像を、CCDカメラ部73に撮影させる波長選択式のダイクロイックミラー及びバンドパスフィルターで構成される。

XYステージ部78は、搬送部80から搬送された細胞培養容器15を、観察部70の観察位置に移動させる水平方向(XY方向)に自在に移動することができる精密ステージである。

[0021] 搬送部80は、搬送アーム81、移動部材82、スクリーシャフト83、アームモータ84及び移動モータ85を備え、恒温槽11内の搬出入部12、収納部60又は観察部70に細胞培養容器15をホルダ16とともに搬送する搬送機構である。搬送部80は、表面に螺旋状の溝を設けたスクリーシャフト83に螺合された移動部材82が、移動モータ85により駆動され、鉛直方向に移動し(矢印B)、移動部材82に支持される搬送アーム81が、アームモータ84により水平方向に移動して(矢印C)、搬出入部13、収納部60又は観察部70に対して細胞培養容器15の受け渡しをする。また、スクリーシャフト83は、図1の紙面と垂直方向(水平方向)にも移動する機構(不図示)を備えている。

[0022] 観察制御部100は、焦点検出部110、最適焦点判別部120、蛍光観察部130及び画像処理部140を備え、操作入力部40及び制御部50の指令信号に基づいて、

観察部70を統合制御する制御器である。

焦点検出部110は、広域検出部111、限定検出部112及び詳細検出部113を備え、対物レンズ部71をZ軸機構部72により上下動させて、CCDカメラ部73の画像により合焦点の位置を自動的に検出(オートフォーカス)する回路である。焦点検出の時間を短縮させるために、情報記憶部20から細胞の情報及び細胞培養容器15の種類の情報などを読み出して、読み出した内容に基づいて、細胞の種類や細胞培養容器15の底面の厚みなどを考慮した焦点検出のための最適な対物レンズ部71の初期位置を演算し、対物レンズ部71をその初期位置に移動させることができる。なお、合焦点の位置は、画像中の画素のコントラストの最大及び最小値を画像内に取得し、その軌跡から算出された最大値となる位置(MaxMin法)か、又は、取得した画像のコントラストの各ラインにおける隣同士の画素データの差を計算し、その絶対値の和を、取得した画像毎に算出して、その最大値となる位置($\Sigma | \Delta |$ 法)にすることにより決定される。

[0023] 広域検出部111は、Z軸方向すなわち対物レンズ部71の光軸方向に広い範囲に渡って対物レンズ部71を駆動させながら焦点検出動作を実行するものである(広域スキャン動作)。具体的には、対物レンズ部71の焦点深度に対して荒いステップ移動量でステップ駆動させて焦点検出を行うか、或いは対物レンズ部71を連続的に駆動させながら焦点検出を行う。

限定検出部112は、広域検出部111より狭く限定された範囲において対物レンズ部71を駆動させながら焦点検出動作を実行するものである(限定スキャン動作)。具体的には、広域検出部111により求められた対物レンズ部71の合焦点位置を含む限定された範囲を焦点検出領域に設定し、対物レンズ部71の焦点深度に対して中程度に荒いステップ移動量でステップ駆動させて焦点検出を行うか、或いは対物レンズ部71を連続的に駆動させながら焦点検出を行う。

[0024] 詳細検出部113は、限定検出部112より狭く限定された範囲において対物レンズ部71を駆動させながら焦点検出動作を実行するものである(詳細スキャン動作)。具体的には、限定検出部112により求められた対物レンズ部71の合焦点位置を含む限定された範囲を焦点検出領域に設定し、対物レンズ部71の焦点深度に対して微

細なステップ移動量でステップ駆動させて焦点検出を行うか、或いは対物レンズ部71を連続的に駆動させながら焦点検出を行う。

上述したように、広域検出部111、限定検出部112及び詳細検出部113の三段階の焦点検出部110を設けることにより、合焦点を精度良く検出できる。

[0025] 最適焦点判別部120は、焦点検出部110の各検出部111～113においてそれぞれ最適な合焦点位置を識別するものである。例えば、最適焦点判別部120は、広域検出部111の広域スキャン動作により複数の焦点検出信号が得られるが、各焦点検出信号を相対評価して最適な焦点検出信号を抽出し、その焦点検出信号に基づいて求められた焦点位置を最適な合焦点位置と決定する。同様に、限定検出部112や詳細検出部113においての最適な合焦点位置を決定する。この最適な合焦点位置が、上述した各検出部111～113のスキャン駆動する焦点検出領域を決める基準となっている。

この最適焦点判別部120により、最終的に得られた詳細検出部113の最適合焦点位置に基づいて、CCDカメラ部73により位相差画像の取得が実行される。図3(A)に示すような位相差画像が、CCDカメラ部73により取得される。

[0026] 具体的には、詳細検出部113の最適合焦点位置が求まると、対物レンズ部71は、その最適合焦点位置を基準点にしてZ軸方向にステップ駆動制御され、CCDカメラ部73は、ステップ駆動毎に位相差画像を取得し、情報記憶部20に記憶させる。このステップ駆動のステップ移動量は、詳細検出部113よりも微細な移動量に設定される。また、最適な合焦点位置は、上述した焦点検出部110と同様に、画像のコントラスト値により決定される。

蛍光観察部130は、細胞の蛍光性たんぱくを蛍光照明部75により発現させて、蛍光フィルタ部76を介してCCDカメラ部73に蛍光画像を撮影させる回路である。なお、蛍光画像は、最適焦点判別部120により判別された最適な合焦点位置に、対物レンズ部71を移動させて撮影される。

[0027] 画像処理部140は、蛍光観察部130により撮影された蛍光画像と、最適焦点判別部120により判別されて撮影された最適な合焦点位置の位相差画像とを重ね合わせて、重ね合わせ画像を作成する画像処理回路である。蛍光画像は、図3(B)に示す

ように、蛍光照明により発光した点のみが画像として現れるので、図3(A)に示す位相差画像と重ね合わせることにより、図3(C)に示すような重ね合わせ画像が作成され、どの細胞の、どの器官が発光しているのかを、容易に確認することができる。

[0028] 次に、細胞培養装置10の使用方法について説明する。

図4は、細胞培養装置の使用方法を示すフローチャートである。図5は、細胞培養装置の対物レンズ部の検出開始位置を説明する図である。

細胞培養装置10は、細胞の観察作業を開始するときに(S200)、細胞培養容器15を、収納部60又は搬出入部13から観察部70のXYステージ部78へ搬送部80により搬送し(S201)、細胞及び細胞培養容器15の情報を情報記憶部20から読み出して確認し、また、読み出した情報に基づいて、観察部70の対物レンズ部71の焦点検出の初期位置を演算する(S202)。続いて、XYステージ部78が、図2に示すように、細胞培養容器15を観察部70の撮影光路上に移動し(S203、矢印D)、Z軸機構部72が、対物レンズ部71を演算した初期位置へ移動させる(S204、矢印E)。

[0029] 対物レンズ部71が初期位置へ移動したら、広域検出部111により、対物レンズ部71の焦点位置を、焦点検出領域の広い範囲から検出する(S205)。ここで、対物レンズ部71の初期位置は、XYステージ部78に載置された細胞培養容器15の底面の厚みが考慮され、例えば、図5に示すように、底面から7mm上方のスキャン開始点Aから下方に向かって広域検出部111による焦点の調節が行われる。

続いて、限定検出部112により、広域検出部111で検出された焦点位置を、限定した限定領域に対して検出し(S206)、更に、詳細検出部113により、限定検出部112で検出された焦点位置を、限定領域よりも更に限定した詳細領域に対して検出して、焦点検出部110の合焦点位置とする(S207)。ここで、限定検出部112及び詳細検出部113の検出開始位置は、前述の広域検出部111の検出開始位置(初期位置)よりも段階的に低く設定され、スキャン範囲が狭くなるように設定されている。例えば、限定検出部112の検出開始位置は、図5に示すように、スキャン開始点Bに設定され、広域検出部111の検出開始位置より下方に設定される。

焦点検出部110により合焦点位置が検出されたら、その点を基準点として、最適焦点判別部120により、対物レンズ部71を、その基準点から上下(焦点)方向に複数点

、微細にステップ移動させて、ステップ移動毎の位相差画像(図3(A))を撮影するとともに、最適な合焦点位置を判別する(S208)。撮影した位相差画像は、情報表示部30に表示するのとともに、情報記憶部20に観察情報として記憶させる(S209)。

[0030] 次に、蛍光観察の実施をするか否か確認し(S210)、蛍光観察を実施するときは(S210、Yes)、情報記憶部20の細胞の情報を再確認し、必要に応じて、蛍光観察に必要な追加情報を操作入力部40により入力する(S211)。再確認及び入力を終えたら、対物レンズ部71をZ軸機構部72により最適な合焦点位置に移動し(S212)、蛍光観察部130により、蛍光画像(図3(B))を撮影して、情報表示部30に表示するとともに、情報記憶部20に保存する(S213)。次に、重ね合わせ画像(図3(C))を作成する重ね合わせ処理を、実施するか否か確認する(S214)。

重ね合わせ処理を実施するときは(S214、Yes)、画像処理部140により、位相差画像と蛍光画像とを重ね合わせる画像処理を行い(S215)、重ね合わせた画像(図3(C))を情報表示部30に表示するとともに、情報記憶部20に保存させて(S216)、保存が完了したら作業終了となる(S217)。

また、蛍光観察を実施しないとき(S210、No)、及び、重ね合わせ処理を実施しないときは(S214、No)、そのまま作業終了となる(S217)。

ここで、収納部60に収納される複数の細胞培養容器15のそれぞれに個別の識別番号(ID)を付して、最初に観察したときの最適な合焦点位置を情報記憶部20に記憶させることによって、次回の観察時にその記憶した合焦点位置を用いて、最適な合焦点位置をすばやく検出することが可能となる。特に、定期的な観察を必要とする場合などに、効率よく、迅速に細胞の観察を実施することができる。

[0031] 次に、細胞培養容器15の細胞観察において、複数の観察ポイントを観察する場合について説明する。

第一番目の観察ポイントに対しては、上述した図4の制御に従い最適合焦点位置が求められ、そこでの複数の位相差画像や蛍光画像を取得し、情報記憶部20に保存する。

第一番目の観察ポイントから別の第二番目の観察ポイントに移動した場合には、最適合焦点位置を次のように求めることで、操作効率を向上できる。すなわち、第一番

目の観察ポイントで得られた広域検出部111の最適合焦点位置、あるいは限定検出部112の最適合焦点位置に基づいて、次の焦点検出部(限定検出部112あるいは詳細検出部113)を実行すれば処理効率を向上できる。この処理は、図4のステップS206或いはステップS207以降の処理を実行することになる。

以上より、実施形態の細胞培養装置10は、対物レンズ部71の合焦点位置を検出する焦点検出部110と、合焦点位置に基づいて最適な合焦点位置を判別する最適焦点判別部120と、対物レンズ部71を最適な合焦点位置に移動させて蛍光観察を行う蛍光観察部130とを備えているので、最適な合焦点位置を迅速に検出して、細胞の蛍光画像を鮮明に、精度よく観察することができる。

請求の範囲

- [1] 細胞の培養経過を観察する観察部を有した細胞培養装置において、
前記観察部の撮影光学系の焦点位置を検出する焦点検出部と、
前記焦点検出部により検出された前記焦点位置に基づいて、前記焦点位置から光軸方向に前記撮影光学系を微小移動量ずつステップ移動させて複数の画像を撮影し、それらの画像に基づいて、最適な合焦点位置を判別する最適焦点判別部と、
前記最適焦点判別部により検出された前記最適な合焦点位置に、前記撮影光学系を移動して、前記細胞の蛍光画像を撮影する蛍光観察部と、
を備える細胞培養装置。
- [2] 請求項1に記載の細胞培養装置において、
前記焦点検出部は、
前記撮影光学系の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部と、
前記広域検出部の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部と、
前記限定検出部の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部とを備えること、
を特徴とする細胞培養装置。
- [3] 請求項1又は請求項2に記載の細胞培養装置において、
前記焦点検出部は、前記撮影光学系をステップ状又は連続的に移動させて各焦点位置を検出し、
前記最適焦点判別部は、前記焦点検出部の前記ステップ状又は連続の移動量よりも小さい移動量で前記撮影光学系を移動させること、
を特徴とする細胞培養装置。
- [4] 請求項1から請求項3までのいずれか1項に記載の細胞培養装置において、
前記最適な合焦点位置の前記画像と、前記蛍光観察部により撮影した前記蛍光画

像とを重ね合わせて重ね合わせ画像を作成する画像処理部を備えること、
を特徴とする細胞培養装置。

- [5] 細胞の培養状態を観察する観察部を有する細胞培養装置において、
前記観察部の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部と、
前記広域検出部の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部と、
前記限定検出部の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部と、
前記詳細検出部で検出された合焦点位置を含み、前記光軸方向に所定の焦点検出領域を設定し、この所定の焦点検出領域内を前記観察部の光学系を移動させながら複数枚の画像を取得する画像取得手段とを備えること、
を特徴とする細胞培養装置。

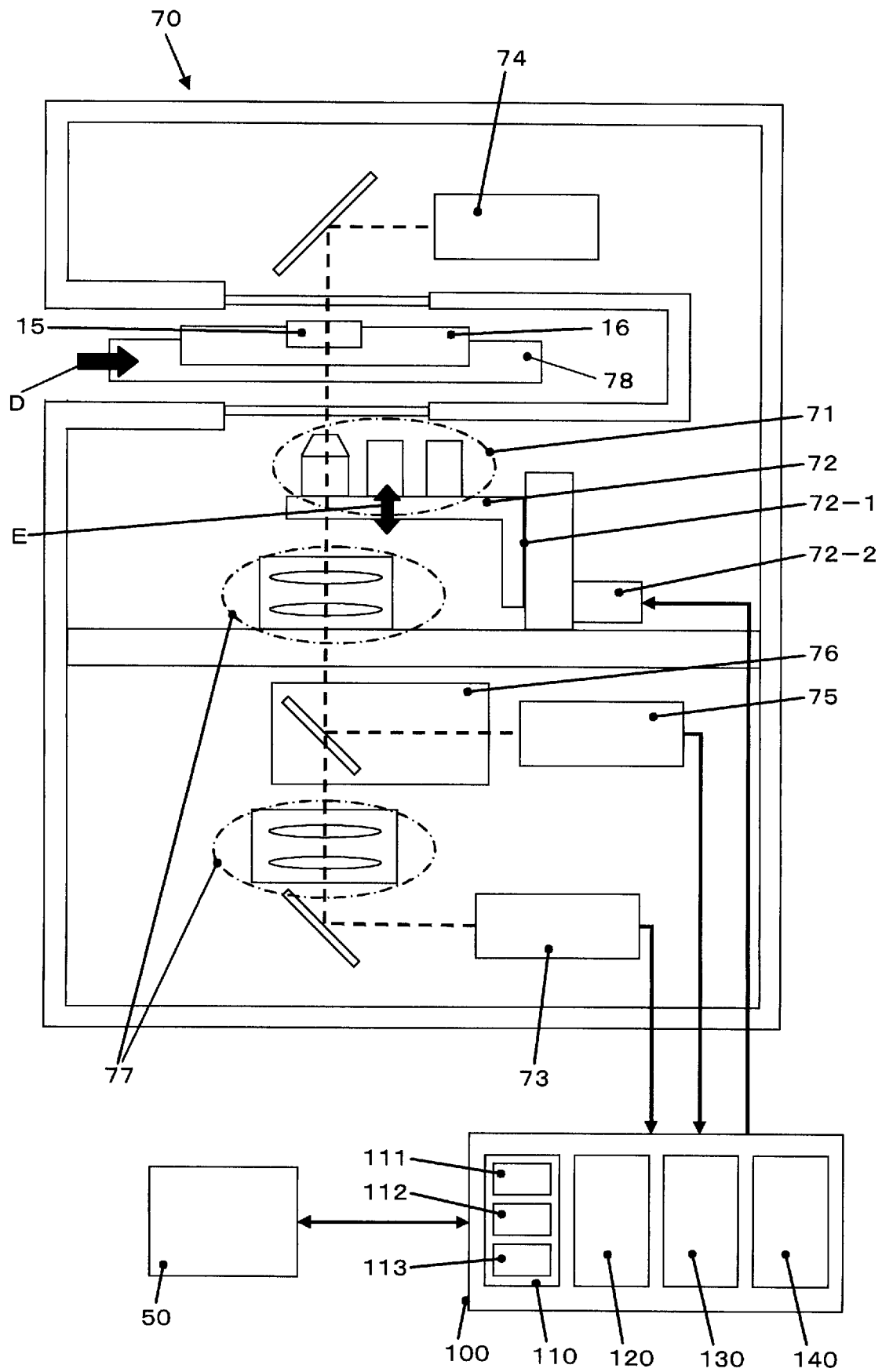
- [6] 細胞培養容器を載置するステージと、前記細胞培養容器内の細胞の培養状態を観察する観察部と、前記ステージ及び前記観察部を相対移動させる移動手段とを有する細胞培養装置において、
前記観察部の光軸方向に広い範囲を焦点検出領域に設定し、この広い焦点検出領域を焦点検出する広域検出部と、
前記広域検出部の広い焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記広域検出部で検出された合焦点位置を含む領域を限定焦点検出領域に設定し、この限定焦点検出領域を焦点検出する限定検出部と、
前記限定検出部の限定焦点検出領域より狭い限定された領域であって、前記限定検出部で検出された合焦点位置を含む領域を詳細焦点検出領域に設定し、この詳細焦点検出領域を焦点検出する詳細検出部と、
前記詳細検出部で検出された合焦点位置を含み、前記光軸方向に所定の焦点検出領域を設定し、この所定の焦点検出領域内を前記観察部の光学系を移動させな

がら複数枚の前記細胞の画像を取得する画像取得手段と、

前記移動手段を制御して前記細胞培養容器内において異なる観察ポイントに移動させ、移動後の前記観察ポイントにおいて前記画像取得手段により前記細胞の画像を取得させる際に、移動前の観察ポイントの前記広域検出部の合焦点位置、又は、移動前の観察ポイントの前記限定検出部の合焦点位置を用いて、次の処理を実行するよう前記限定検出部、前記詳細検出部及び前記画像取得手段を制御する制御手段とを備えること、

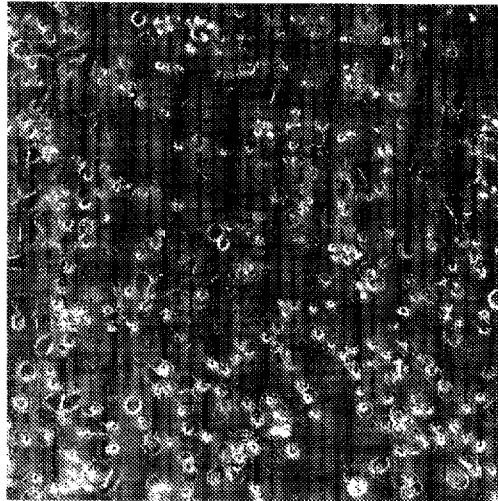
を特徴とする細胞培養装置。

[図2]

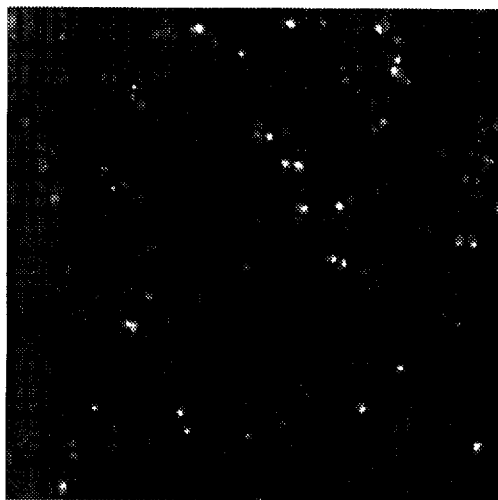


[図3]

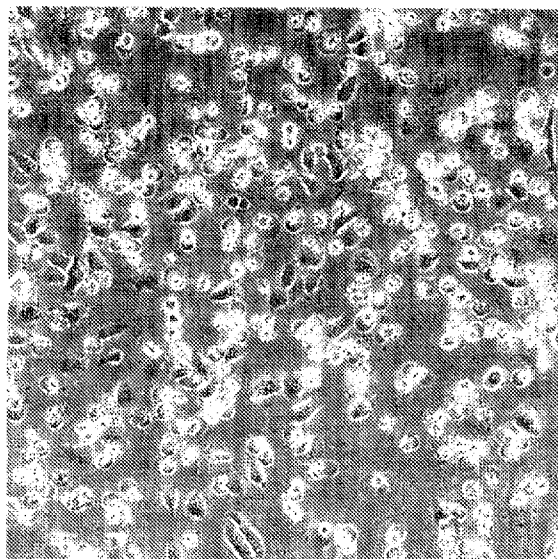
(A)



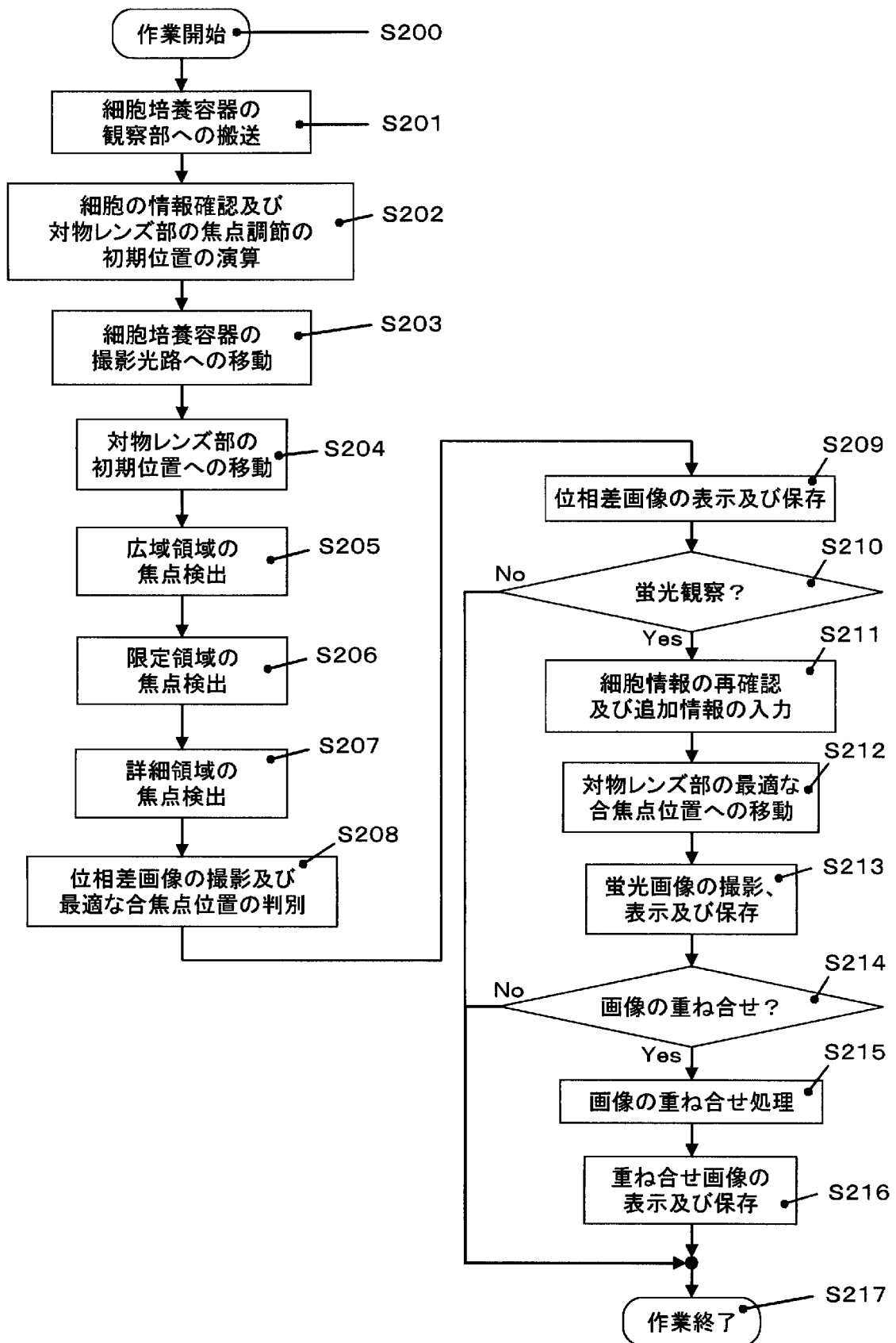
(B)



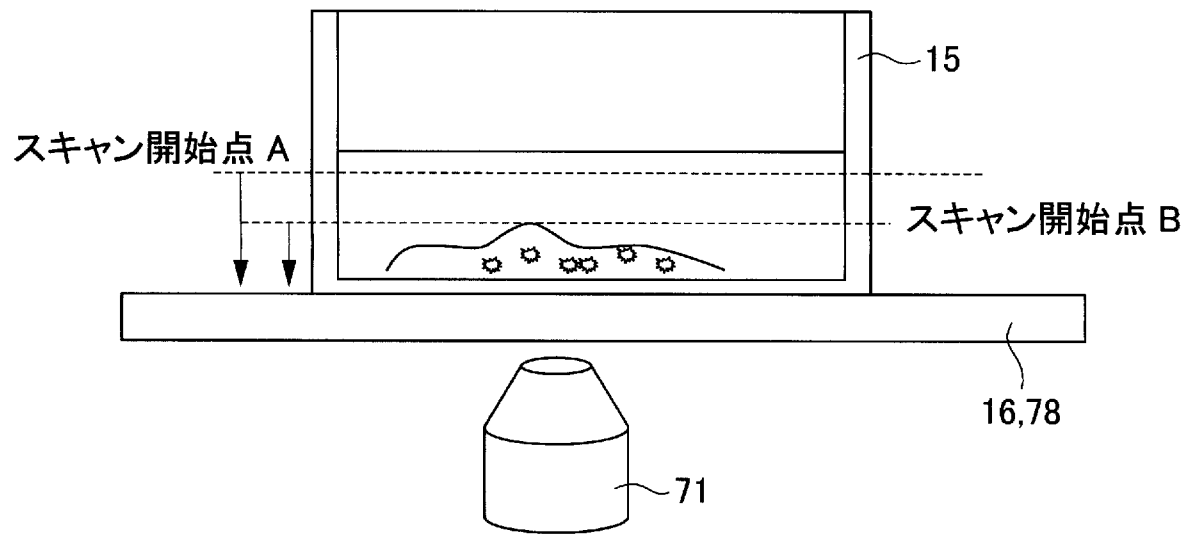
(C)



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/00(2006.01) i, G02B7/04(2006.01) i, G02B21/00(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)

C12M3/00, G02B7/04, G02B21/00

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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

JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, A	WO 2007/074923 A1 (Olympus Corp.), 05 July, 2007 (05.07.07), Claims; Fig. 8 (Family: none)	1 - 4
A	WO 2002/048693 A (Olympus Corp.), 20 March, 2002 (20.03.02), Claim 11 & EP 1351048 A1 & US 2004/051051 A1	1 - 4
A	JP 2004-113175 A (Olympus Corp.), 15 April, 2004 (15.04.04), Claims; Par. No. [0001] (Family: none)	1 - 4

☒ 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
28 August, 2007 (28.08.07)

Date of mailing of the international search report
11 September, 2007 (11.09.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061223

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-153260 A (Japan Science and Technology Corp.), 28 May, 2002 (28.05.02), Claim 17 & US 2004/0067482 A1 & EP 1344817 A1 & WO 02/042411 A1	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061223

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

The matter common to claims 1-6 is a cell incubator having an observing section for observing cells. However, this common matter is not novel since the common matter is disclosed in document (JP 2004-180675 A (Sanyo Electric Co., Ltd.), 02 July, 2004). In consequence, since the cell incubator having an observing section for observing cells makes no contribution over the prior art, the common matter cannot be a special technical feature.

Therefore, the inventions of claims 1-6 are categorized into the ones (claims 1-4) involving a special technical feature of comprising a focus detecting section, an optimum focus judging section, and a fluorescence observing section and the ones (claims 5, 6) (Continued to the extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 - 4

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061223

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

involving a special technical feature of comprising a wide area detecting section, a limitation detecting section, a detail detection section, and an image capturing section.

Therefore, though claims 1-6 state two general inventive concepts, the general inventive concepts do not share any novel special technical feature. Consequently, this application does not comply with the requirement of unity of invention (Regulations under the Patent Law section 13 (PCT Rule 13.1, 13.2, and 13.3))

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
 Int.Cl. C12M3/00(2006.01)i, G02B7/04(2006.01)i, G02B21/00(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（I P C））
 Int.Cl. C12M3/00, G02B7/04, G02B21/00

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 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 7 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）
 JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

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 請求の範囲の番号
E A	WO 2007/074923 A1(オリンパス株式会社)2007.07.05、請求の範囲、 図8等(ファミリーなし)	1 - 4
A	WO 2002/048693 A(オリンパス株式会社)2002.03.20、請求項11等 & EP 1351048 A1 & US 2004/051051 A1	1 - 4
A	JP 2004-113175 A(オリンパス株式会社)2004.04.15、特許請求の範 囲、0001段落等(ファミリーなし)	1 - 4
A	JP 2002-153260 A(科学技術振興事業団)2002.05.28、請求項17等 & US 2004/0067482 A1 & EP 1344817 A1 & WO 02/042411 A1	1 - 4

☐ 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 2 8 . 0 8 . 2 0 0 7	国際調査報告の発送日 1 1 . 0 9 . 2 0 0 7		
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / 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） 田中 晴絵		4 N
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488		9739

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求の範囲1～6に共通の事項は、細胞を観察する観察部を有する細胞培養装置であるが、当該共通の事項は文献（JP 2004-180675 A(三洋電機株式会社)2004.07.02）に開示されているから新規でなく、結果として、細胞を観察する観察部を有する細胞培養装置は先行技術の域をでないから、この共通事項は特別な技術的特徴とすることはできない。

それ故、請求の範囲1～6に記載された発明は、焦点検出部、最適焦点判別部及び蛍光観察部を備える点に特別な技術的特徴を有するもの（請求の範囲1～4）と、広域検出部、限定検出部、詳細検出部及び画像取得手段を備える点に特別な技術的特徴を有するもの（請求の範囲5、6）に分類される。

してみれば、請求の範囲1～6には、2つの一般的発明概念が記載されているが、それぞれの一般的発明概念の間には、新規な特別な技術的特徴が共有されていないため、この出願は発明の単一性の要件（法施行規則第13条（P C T規則13.1、13.2及び13.3））を満たしていないと認める。

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

請求の範囲1～4

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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