

(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
2012 年 9 月 7 日(07.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/117647 A1

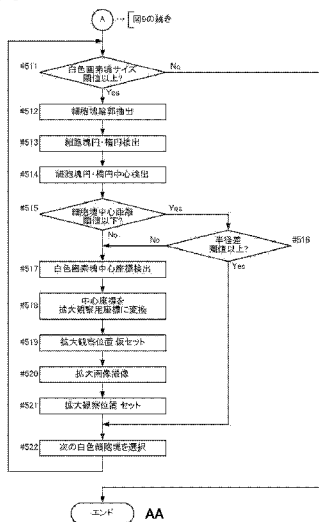
- (51) 国際特許分類:
G02B 21/36 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079763
- (22) 国際出願日: 2011 年 12 月 22 日(22.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-042418 2011 年 2 月 28 日(28.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三洋電機株式会社(SANYO ELECTRIC CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5708677 大阪府守口市京阪本通 2 丁目 5 番 5 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小田 淳志(ODA Atsushi) [JP/JP]; 〒5708677 大阪府守口市京阪本通 2 丁目 5 番 5 号三洋電機株式会社内 Osaka (JP). 北條 三木夫(HOUJOU Mikio) [JP/JP]; 〒5708677 大阪府守口市京阪本通 2 丁目 5 番 5 号三洋電機株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 大橋 雅昭(OHASHI Masaaki); 〒5708677 大阪府守口市京阪本通 2 丁目 5 番 5 号三洋電機株式会社内 Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

[続葉有]

(54) Title: OBSERVATION PROGRAM AND OBSERVATION DEVICE

(54) 発明の名称: 観察プログラムおよび観察装置

【図11】



- A Continued from Fig. 9
- #511 Is white pixel mass size greater than or equal to threshold?
- #512 Extract cell mass contour
- #513 Detect cell mass circle/ellipse
- #514 Detect center of cell mass circle/ellipse
- #515 Is cell mass center distance less than or equal to threshold?
- #516 Is radial difference greater than or equal to threshold?
- #517 Detect white pixel mass center coordinates
- #518 Convert center coordinates to expanded observation coordinates
- #519 Make preliminary setting of enlarged observation location
- #520 Capture enlarged image
- #521 Make setting of enlarged observation location
- #522 Select next white cell mass
- AA End

(57) Abstract: [Problem] To make observation of a sample mass having a proper shape more efficient by automatically sorting sample masses having a proper shape to continue observation, and lowering the observation order or halting the observation of sample masses not having a proper shape. [Solution] On a computer are executed: an overall image capture process which captures an image of a sample by image capturing the entirety of a container in which the sample and a medium are contained; a sample mass identification process which identifies a sample mass from the image which is captured in the overall image capture process wherein a plurality of the samples have come together; and a sample mass assessment process which extracts shape information of the sample mass which is identified with the sample mass identification process and assesses the state of the sample mass on the basis of the shape information.

(57) 要約: 【課題】 観察を続けるのに適正な形状の試料塊を自動的に選別し、適正でない形状の試料塊の観察順位を低くしたり、観察を中止したりすることによって、適正な形状の試料塊の観察をより一層効率良く進める。【解決手段】 コンピュータに、試料と溶液とが入った容器全体を撮像することで前記試料の画像を撮像する全体撮像処理と、前記全体撮像処理で撮像した前記画像から複数の前記試料が寄り集まった試料塊を識別する試料塊識別処理と、前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊の形状情報を抽出し、前記形状情報に基づいて前記試料塊の状態を判定する試料塊判定処理と、を実行させる。



(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 観察プログラムおよび観察装置

技術分野

[0001] 本発明は、観察プログラムおよび観察装置に関する。

背景技術

[0002] 細胞を培養するにあたって、複数の細胞が寄り集まった細胞塊の発現と同時に観察を開始して逐次時系列に観察できれば、例えば再生医療の支援として有望な技術と言える。このような細胞の観察は従来、細胞の培養中、培養容器への培養液の補給、交換が必要になったとき顕微鏡などを用いて行い、必要に応じて画像を撮像するようにしている。

[0003] しかしながら、顕微鏡を用いた細胞の観察は多くの手間を要する。例えば、容器内で発現した細胞塊を特定するためにはまず目視や顕微鏡などで容器全体を観察する必要があり、さらに対物レンズを切り替えるなどして拡大して個々の細胞塊の成育状態を観察しなければならない。拡大観察では視野が狭く、目標の細胞塊を探索するのが困難であり、さらにその細胞塊を視野に合わせるのも困難である。また、細胞を観察する場合、細胞塊の発現のときから成育完了まで、長期間の変化を一定期間ごとに観察するタイムラプス観察を行うことが望まれている。細胞の播種直後は細胞塊を目視や低倍率の顕微鏡などでは観察できないため、数日後に再探索して観察位置を再設定しなければならない。

[0004] また、従来の通常1日～3日程度で1回の培養容器への培養液の補給、交換の際に行われる観察では細胞塊の発現のときからの観察が困難であり、この発現のときから細胞塊を観察可能な技術への要望が強い。さらに、容器全体を観察するときと容器内の一部を拡大して観察するときとの各々における細胞の撮像時に、照明やレンズ駆動系等の発熱による細胞の成育への影響が問題となっている。

[0005] このような細胞の観察に関して、容器全体を観察するときと容器内の一部

を拡大して観察するときとの切り替えの手間を解消した装置が提案され、その一例を特許文献1に見ることができる。特許文献1に記載された観察装置は被観察物を撮像する倍率の異なる少なくとも2つの撮像光学系を備え、高倍率の撮像光学系で撮像した画像特徴量が同時に撮像した低倍率の撮像光学系における画像特徴量とが略等しくなるように低倍率画像の基準値を算出している。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2009-198709号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、特許文献1に記載された観察装置は高倍率の撮像光学系と低倍率の撮像光学系とが共通の光源を用いて撮像しているので、容器内の細胞の詳細を観察することができない。なぜなら、高倍率の撮像光学系では微小な領域のほぼ透明な細胞を観察することに適した位相差光学系に用いられる点光源とリングスリットなどの照明が必要であり、低倍率の撮像光学系では比較的広視野を観察することに適した平面光源などの照明が必要であり、異なる照明が必要となるためである。すなわち、容器内の細胞の分布は観察できても、容器内で発現した細胞塊の特定に失敗したり、目標の細胞塊を誤って識別したりすることが懸念される。また、細胞塊の発現のときから成育完了まで継続して観察を行うことについても考慮されていない。

[0008] 本発明は上記の点に鑑みなされたものであり、容器内の細胞等の試料を観察するにあたって、容器全体を観察して発現した試料塊を特定でき、さらにこの特定した試料塊を拡大して詳細を観察することが可能な観察装置を提供することを目的とする。また、このような特定した試料塊の発現のときから成育完了まで継続して観察を行うことが可能な観察プログラム及び観察システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 前述した課題を解決する主たる本発明は、コンピュータに、試料と溶液とが入った容器全体を撮像することで前記試料の画像を撮像する全体撮像処理と、前記全体撮像処理で撮像した前記画像から複数の前記試料が寄り集まった試料塊を識別する試料塊識別処理と、前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊の形状情報を抽出し、前記形状情報に基づいて前記試料塊の状態を判定する試料塊判定処理と、を実行させることを特徴とする観察プログラムである。

[0010] 本発明の他の特徴については、添付図面及び本明細書の記載により明らかとなる。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、観察を続けるのに適正な形状の試料塊を自動的に選別することができる。そのため、適正でない形状の試料塊の観察順位を低くしたり、観察を中止したりすることによって、適正な形状の試料塊の観察をより一層効率良く進めることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の第1の実施形態に係る観察システムの構成図である。

[図2]図1に示す観察システムの観察装置の垂直断面側面図である。

[図3]図1に示す観察システムの観察装置の垂直断面正面図である。

[図4]図2と同様の観察装置の垂直断面側面図にして、容器を全体観察部に対応する箇所に移動させた状態を示すものである。

[図5]図1に示す観察システムのコンピュータの構成を示すブロック図である。

[図6]図1の観察システムの操作に係るフローを示す説明図である。

[図7]図1の観察システムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

[図8]本発明の第2の実施形態に係る観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

[図9]本発明の第3の実施形態に係る観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

[図10]図9に示す観察処理に係る動作を示すフローチャートの続きである。

[図11]本発明の第4の実施形態に係る観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

[図12]観察を続けるのに適正な形状の細胞塊の一例として、未分化コロニーを示す図である。

[図13]観察を続けるのに適正でない形状の細胞塊の一例として、中央部が分化した分化コロニーを示す図である。

[図14]未分化コロニーの画像に対して、二値化処理および収縮膨張処理を行った結果の一例を示す図である。

[図15]中央部が分化した分化コロニーの画像に対して、二値化処理および収縮膨張処理を行った結果の一例を示す図である。

[図16]未分化コロニーの画像に対して、さらに輪郭抽出、円・楕円検出、および円・楕円中心検出を行った結果の一例を示す図である。

[図17]中央部が分化した分化コロニーの画像に対して、さらに輪郭抽出、円・楕円検出、および円・楕円中心検出を行った結果の一例を示す図である。

[図18]観察を続けるのに適正でない形状の細胞塊の一例として、周辺部が分化した分化コロニーを示す図である。

[図19]周辺部が分化した分化コロニーの画像において、各画素の輝度の度数分布の一例を示すヒストグラムである。

[図20]周辺部が分化した分化コロニーの画像に対して、三値化処理を行った結果の一例を示す図である。

[図21]周辺部が分化した分化コロニーの画像に対して、さらに輪郭抽出、円・楕円検出、および円・楕円中心検出を行った結果の一例を示す図である。

[図22]分化コロニーを拡大観察の対象とする観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書および添付図面の記載により、少なくとも以下の事項が明らかとなる。

[0014] 以下の説明において、「所定サイズ」は試料塊の予め設定したサイズであり、拡大観察の対象とすべきであると判断することができる程度のサイズであって、例えば画像上の画素数で定義して構わない。例えば、試料塊の所定サイズとしての画素数の具体例は全体観察を500万画素のカメラで行って40mm×40mmの視野を撮像した場合、1000ピクセル程度が設定した所定サイズとして適当である。後述する実施形態では「所定サイズ」を画素数にして「1000ピクセル」と設定しているが、このようなサイズに限定されるわけではない。また、以下の手段において用いられる「所定サイズ」についても同様である。

[0015] また、「所定識別期間」（試料塊の識別に関する所定期間）は拡大観察対象試料塊の識別を実行するタイミングについての予め設定した期間であり、試料塊の発現のときを見極められる程度の期間であって、例えば数時間から数日程度の期間とすることが可能であるが必要に応じて適切に設定できる。したがって、後述する実施形態では「試料塊の識別に関する所定期間」を「1日」と設定しているが、このような期間に限定されるわけではない。なお、他の手段において用いられる「所定期間」という語がすべて拡大観察対象試料塊の識別を実行するタイミングについての期間を示すわけではなく、時間的に同じ期間を表すわけでもない。

[0016] また、「所定識別日数」（所定日数）は拡大観察対象試料塊の識別を終了するタイミングについての予め設定した日数であり、例えば5日、7日、10日などといった日数に任意に設定して構わない。後述する実施形態では「所定日数」を「5日」と設定しているが、このような日数に限定されるわけではない。

[0017] また、「所定撮像期間」（拡大画像の撮像に関する所定期間）は拡大した試料塊の撮像を実行するタイミングについての予め設定した期間であり、試料塊の成育過程を見極められる程度の期間であって、例えば数時間から数日

程度の期間とすることが可能であるが必要に応じて適切に設定できる。したがって、後述する実施形態では「拡大画像の撮像に関する所定期間」を「１日」と設定しているが、このような期間に限定されるわけではない。なお、他の手段において用いられる「所定期間」という語がすべて拡大した試料塊の撮像を実行するタイミングについての期間を示すわけではなく、時間的に同じ期間を表すわけでもない。

[0018] また、「所定観察期限」（所定期限）は試料の観察を終了するタイミングについての予め設定した期限であり、例えば試料の観察開始から１０日、２０日、３０日などといった期限に任意に設定して構わない。後述する実施形態では「所定期限」を「１０日」と設定しているが、このような期限に限定されるわけではない。

[0019] また、「所定形状」は試料塊の予め設定した形状であり、観察するに好適に成育し続ける可能性が高いと判断することができる程度の形状であってできるだけ円形に近いものが良く、例えば楕円形度などの数値で任意に設定して構わない。後述する実施形態では「所定形状」を「楕円形度にして１．１以下」と設定しているが、このような形状に限定されるわけではない。

[0020] 以下、本発明の実施形態を図１～図２１に基づき説明する。なおここでは、例えば細胞、細菌、微生物などの試料のうち細胞を試料とし、例えば培養液を溶液として説明する。また、複数の細胞が寄り集まった細胞塊を試料塊として説明する。

[0021] （第１の実施形態）

最初に、本発明の第１の実施形態に係る観察システムについて、図１～図５を用いてその構造を説明する。図１は観察システムの構成図、図２は観察システムの観察装置の垂直断面側面図、図３は観察装置の垂直断面正面図、図４は観察装置の垂直断面側面図にして、容器を全体観察部に対応する箇所に移動させた状態を示すもの、図５は観察システムのコンピュータの構成を示すブロック図である。なお、以下の説明において、図２及び図３のｘ軸方向を左右方向、ｙ軸方向を前後方向（＋ｙ方向を前方、－ｙ方向を後方）、

z 軸方向を上下方向とする。

[0022] 観察システム S は、図 1 に示すように観察装置 1、制御装置 100、及びコンピュータ 200 を備えている。

[0023] 観察装置 1 は細胞などの試料を観察するための装置であって、制御装置 100 が接続されている。制御装置 100 は観察装置 1 を制御するための装置であって、観察装置 1 を駆動するための図示しないドライバやコントローラなどを内蔵している。そして、制御装置 100 はコンピュータ 200 に接続されている。コンピュータ 200 は、例えば所謂パーソナルコンピュータであって、細胞などの試料を観察するための図示しない観察プログラムなどを実行する。すなわち、コンピュータ 200 は制御装置 100 に指令を送って観察装置 1 を制御したり、観察時に撮像した画像の取得、保存などを実行したりすることが可能になっている。

[0024] 観察装置 1 は、図 1 ～図 4 に示すようにその筐体である本体 2 に全体観察部 10、拡大観察部 20、搬送部 30、及び駆動部 40 を備えている。

[0025] 観察装置 1 はその正面中央部に配置された細胞と細胞の培養液とが入った容器 C 内の細胞の全体観察部 10 及び拡大観察部 20 を用いた観察が可能である。駆動部 40 によって容器 C を把持する搬送部 30 を前後、左右の所望の方向、位置に移動させることができる。本体 2 は床面に対して 4 箇所 に設けられた脚部 3 によって支持されている。なお、容器 C は容器外部からの汚染や他の容器との間での汚染などを防止するために蓋が設けられている。

[0026] 全体観察部 10 は本体 2 の密閉された筐体内部の前側の部分に設けられ、全体観察光学系であるレンズ 11 と、撮像部である CMOS カメラ 12 と、全体観察照明であるリング照明 13 とを備えている。

[0027] レンズ 11 は容器 C を把持する搬送部 30 の移動空間の上方に配置され、下方に向かって容器 C 内を観察可能にして設けられている。CMOS カメラ 12 はレンズ 11 の鉛直上方に設けられ、その撮像素子面が下方のレンズ 11 の方を向くように配置されている。

[0028] リング照明 13 は斜め上方を向く形で取り付けられた複数の LED がリン

グ状に配列された構造をなし、搬送部 30 の移動空間の下方に配置されている。なお、リング照明 13 と搬送部 30 の容器 C との間には所定距離離れた空隙 D を有している（図 4 参照）。これにより、リング照明 13 と容器 C との間に空気が流通する空間が生じるので、リング照明 13 が発する熱が容器 C に伝わり難くなる。したがって、リング照明 13 の発熱による影響が細胞の成育に及ぶのを抑制できる。そして、リング照明 13 は斜め上方であってリングの中心に向かって光を照射し、リング照明 13 の上方に位置する搬送部 30 の観察対象である容器 C 内の細胞を照らす。なお、CMOS カメラ 12 及びレンズ 11 は互いの光軸が一致するように各々配置され、その光軸がリング照明 13 の中心を通過するようにリング照明 13 が配置されている。

[0029] このような構成により、全体観察部 10 はリング照明 13 を用いて容器 C に光を照射することによりレンズ 11 を経て得られる像が CMOS カメラ 12 の撮像素子面で結像し、容器 C 全体を撮像することで容器 C 内の細胞の画像を撮像する。そして、撮像した画像が記憶されるので、容器 C 内の複数の細胞が寄り集まった細胞塊の識別や特定が容易になる。

[0030] また、全体観察部 10 が容器 C の下方から斜め上方に容器 C に対して光を照射するので、容器 C の底面のうち、細胞の存在する箇所を通過する光は細胞によって散乱し、散乱した光の一部がカメラに入射して細胞が白く映り、細胞のない箇所を通過する光は散乱せず、光がカメラに入射せず黒く映る。このようにして、容器 C の内底面近傍で発現、成育する細胞を特定するのに適正な光を照射することができる。そして、細胞の外形状を白い塊として認識できるコントラストが得られる。なお、下方から光を照射することにより、容器 C の蓋による反射光で細胞が白つぶれして観察できなくなることを防ぐ効果が得られる。

[0031] 拡大観察部 20 は所謂位相差顕微鏡であって本体 2 の密閉された筐体内部の全体観察部 10 より後方の箇所に設けられ、対物レンズ 21、反射ミラー 22、ズームレンズ 23 といった拡大観察光学系と、撮像部である CCD カメラ 24 と、拡大観察照明である位相差照明部 25 とを備えている。

[0032] 対物レンズ 21 は搬送部 30 の移動空間のすぐ下方に配置され、上方に向かって容器 C 内を観察可能にして設けられている。なお、容器 C の底面に最も接近するレンズ部である対物レンズ 21 の周辺には下部本体 2 内で発生する熱が容器 C に影響を及ぼすのを防止するためのカバー部材である対物レンズカバー 26 が設けられている。また、対物レンズカバー 26 の上部先端であって対物レンズ 21 と容器 C との間の箇所には窓部 27 が設けられている。

[0033] ここで、熱は密閉された筐体内のモータやカメラ、照明から発生して充満し、対物レンズ 21 付近にも滞留して上方へ発散しようとする。少ない面積の対物レンズカバー 26 ではなく、拡大観察光学系全部を覆うカバーとした場合、拡大観察光学系と容器 C 底面との接近は筐体内の熱が伝達し易くなり、培養液温度が上昇し易くなってしまう。

[0034] これに対して、対物レンズカバー 26 は容器 C 底面に接近している箇所の面積をできるだけ少なくすることで、容器 C 底面と対物レンズカバー 26 との隙間がほとんどなく、空気が流通しないことに起因する熱影響を抑制している。同時に、対物レンズカバー 26 は対物レンズ 21 周辺のみを覆うことで対物レンズカバー 26 の表面積を増大することができるので、空気が流通し易い対物レンズカバー 26 の横方向へも熱発散することができ、容器 C への熱伝達を抑制することが可能である。

[0035] このようにして、拡大観察光学系と容器 C との間に、対物レンズ 21 周辺のみを覆う、窓部 27 を備えた対物レンズカバー 26 を構成することにより、拡大観察光学系が発する熱が容器 C に伝わり難くなる。したがって、レンズ駆動系の発熱による影響が細胞の成育に及ぶのを抑制できる。

[0036] 反射ミラー 22 は対物レンズ 21 の下方に配置され、後方に向かって略水平に光を反射するよう傾斜させて設けられている。反射ミラー 22 は対物レンズ 21 から得られた像を後方のズームレンズ 23 に導く。ズームレンズ 23 は反射ミラー 22 の後方に前後方向に延びる形で配置され、対物レンズ 21 から得られた像を拡大する。CCD カメラ 24 はズームレンズ 23 のさら

に後方に設けられ、その撮像素子面が前方のズームレンズ２３の方を向くように配置されている。

[0037] 位相差照明部２５は本体２の上部に設けられ、ＬＥＤ２５ａと、反射ミラー２５ｂとを備えている。ＬＥＤ２５ａは位相差照明部２５の下方に位置する搬送部３０の観察対象である容器Ｃ内の細胞を照らす光を照射する。反射ミラー２５ｂは対物レンズ２１の鉛直上方に配置され、ＬＥＤ２５ａが照射した光が容器Ｃを経て対物レンズ２１に到達するよう光を反射させる。

[0038] このような構成により、拡大観察部２０は位相差照明部２５を用いて容器Ｃに光を照射することにより対物レンズ２１、反射ミラー２２、及びズームレンズ２３を経て得られる像がＣＣＤカメラ２４の撮像素子面で結像し、容器Ｃ内の一部の領域を拡大して容器Ｃ内の細胞を画像として撮像する。そして、撮像した画像が記憶されるので、容器Ｃ内の細胞塊の識別や特定、詳細な観察が容易になる。

[0039] また、拡大観察部２０は細胞を拡大して観察するための複数のレンズとそのズーム機構とを有する比較的重量が重い拡大観察光学系が下方に配置されるので、装置の重量バランスが適正になって安定した拡大観察が可能になる。そして、容器Ｃの内底面近傍で発現、成育する細胞に対して容器Ｃの下方から対物レンズ２１を接近させることができるので、焦点距離を短くして比較的大きな拡大率で観察することが可能である。さらに、拡大観察部２０は容器Ｃの下方から観察するので、容器Ｃの蓋の汚れの影響を受けることなく観察することが可能である。

[0040] 搬送部３０は本体２の正面中央部であって、下方の全体観察部１０のリング照明１３や拡大観察部２０の拡大観察光学系と、上方の全体観察部１０の全体観察光学系や拡大観察部２０の位相差照明部２５とに挟まれた形で設けられている。搬送部３０はホルダ３１を備え、このホルダ３１が観察対象である細胞と細胞の培養液とが入った容器Ｃを把持している。ホルダ３１は全体観察部１０と拡大観察部２０とに対して位置決めがなされ、容器Ｃはホルダ３１に対して位置決めがなされている。これにより、容器Ｃとホルダ３１

とを一緒に取り外して培養液を交換したり、試薬を投入したりしても、全体観察部 10 と拡大観察部 20 とにおいて同一箇所の観察が容易である。

[0041] 駆動部 40 は搬送部 30 の後方及び側方に設けられ、x 軸駆動機構 41、x 軸モータ 42、y 軸駆動機構 43、y 軸モータ 44、z 軸モータ 45、及びズームモータ 46 を備えている。なお、図 2 及び図 3 に示すように観察装置 1 に対して左右方向を x 軸と、前後方向を y 軸と、上下方向を z 軸として説明する。

[0042] x 軸駆動機構 41 は搬送部 30 のすぐ後方に配置されるとともに搬送部 30 を直接支持している。x 軸駆動機構 41 は図示しないベルト、プーリ、スライドガイド部材、シャフト等を備えて x 軸モータ 42 によって駆動され、搬送部 30 を左右方向に移動させる。y 軸駆動機構 43 は搬送部 30 及び本体 2 の側面の箇所に配置され、x 軸駆動機構 41 を支持している。y 軸駆動機構 43 は図示しないベルト、プーリ、スライドガイド部材等を備えて y 軸モータ 44 によって駆動され、x 軸駆動機構 41 とともに搬送部 30 を前後方向に移動させる（図 4 参照）。

[0043] このような駆動機構を動作させることにより、搬送部 30 は全体観察部 10 から拡大観察部 20 まで、またはその逆方向に容器 C を搬送する。容器 C が移動されるので、全体観察部 10 と拡大観察部 20 とが離れた箇所に配置されていても容器 C 全体を観察して発現した細胞塊を特定でき、さらにこの特定した細胞塊を拡大して詳細を観察することが可能になる。

[0044] また、搬送部 30 は上記のように全体観察部 10 と拡大観察部 20 の光軸方向と垂直をなす方向に容器 C を搬送するものであって、搬送方向の少なくとも一方向、すなわち前後方向を共通にしていることにより全体観察部 10 における観察視野内の座標を拡大観察部 20 における観察視野内の座標に一致させる。これにより、全体観察部 10 と拡大観察部 20 との互いの観察視野内における座標が一致するので、全体観察部 10 で容器 C 全体を観察して特定した細胞塊を拡大観察部 20 で容易に識別できる。したがって、目標の細胞塊を誤って識別することが防止され、高精度な観察が実現できる。

- [0045] z軸モータ45及びズームモータ46は搬送部30後方の本体2内に配置されている。z軸モータ45は拡大観察光学系及びCCDカメラ24を上下方向に移動させるためのモータである。ズームモータ46はズームレンズ23の拡大倍率の変更させるためのモータであり、撮像する画像の倍率変更が可能である。
- [0046] コンピュータ200は、図5に示すように演算部201を少なくとも備えている。なお、記憶部210、計時部202、入力部203、及び出力部204を備えてもよい。
- [0047] 演算部201は一般的なマイコンやその他の電子部品によって構成され、このマイコン内部や記憶部210等に記憶、入力された観察プログラム220やその他のデータ等に基づいて観察装置1に係る一連の観察動作を制御する。なお、全体観察部10または拡大観察部20によって撮像された画像の処理を行う画像処理部を別途設けても良い。
- [0048] 演算部201で実行される観察プログラム220は、図5に機能ブロック図でハードウェア的に示したように細胞塊識別部221、細胞塊ソート部222、座標検出部223、座標変換部224、細胞塊抽出部225、形状識別部226、及び形状判定部227を備えている。なお、観察プログラム220はこれら各々の処理ブロックのほか、観察装置1の全体観察部10に指令を送り容器C全体を撮像することで細胞の画像を撮像させる全体撮像処理と、拡大観察部20に指令を送り容器C内を拡大して細胞の画像を撮像させる拡大撮像処理とを実行する。
- [0049] 細胞塊識別部221はまずカラー画像の場合はグレー画像に変換した上で、全体撮像処理で撮像した画像の細胞塊でない部分と細胞塊の部分とを所定の閾値を用いて区別する。これにより、細胞塊でない部分が黒に細胞塊の部分が白に二値化される。そして、細胞、すなわち白色の画素数を算出する。この白色の画素数を算出する方式としては、例えば白色の画素の連結領域を算出するラベリング方式や任意位置の予め定めた小領域内の白色の画素数ができるだけ多くなるように領域を算出する小領域方式などが掲げられる。

[0050] ラベリング方式は単一の白色画素領域の大きさや白色画素領域の密集度合いによって細胞塊を識別する方式であり、小領域方式は白色画素領域の数や多さ、密集度合いによって細胞塊を識別する方式である。この他に、細胞塊の単離度合い（個々の細胞塊同士が所定の距離を保って存在している度合い）によって識別しても良い。なお、ここではラベリング方式を採用することとする。

[0051] ラベリング処理は二値化処理された画像に関して、隣接する白色画素（または黒色画素）に同じ番号（ラベル）を割り振ることにより複数の画素をグループ化する処理のことである。ラベリング処理における隣接の判定では4連結（4近傍）と8連結（8近傍）とを用いる。4連結では注目画素の上下左右に連続していれば隣接と判定し、8連結ではさらに斜め4方向の連続も加味して隣接を判定する。このようにして、細胞塊識別部221は全体撮像処理で撮像した画像から二値化した白色画素の塊、すなわち細胞塊を識別する。

[0052] そして、細胞塊識別部221は識別した細胞塊のうち所定サイズ以上の細胞塊を拡大観察対象細胞塊として認識する。「所定サイズ」は細胞塊の予め設定したサイズであり、拡大観察の対象とすべきであると判断することができる程度のサイズである。ここでは、所定サイズを例えば画素数にして1000ピクセルと設定し、記憶部210などに記憶している。これにより、画素数にして1000ピクセル以上の細胞塊が拡大観察対象細胞塊として認識されるので、細胞塊の発現のときを見極めることができる。したがって、細胞塊の発現のときから成育完了まで継続して観察を行うことが可能になる。

[0053] 細胞塊ソート部222は細胞塊識別部221で識別された細胞塊、すなわち白色の画素の塊のうち、画素数の多いものから順にソートを実行する。そして、例えば画素数の多いものから順に予め定められた個数の細胞塊が観察対象などとして選択される。

[0054] 座標検出部223は細胞塊識別部221で識別され、細胞塊ソート部222でソートされた細胞塊、すなわち白色画素の塊の中心座標を検出する。

- [0055] 座標変換部 224 はまず全体撮像処理で撮像した画像上の画素による座標を算出する。そして、画像中心を原点とする実寸に変換する。ここで、画像の歪曲収差などの各種収差を補正しても良い。さらに、座標変換部 224 はこの実寸で表された画像上位置に整合するように、実寸を観察装置 1 の駆動部 40 の x 軸モータ 42 及び y 軸モータ 44 のモータパルス数に変換する。このようにして、座標変換部 224 は拡大撮像処理で撮像する画像上の座標が全体撮像処理で撮像した画像上の座標に一致する共通の座標系を形成する。
- [0056] 細胞塊抽出部 225 は拡大撮像処理で撮像された画像から座標検出部 223 が検出した座標の細胞塊を抽出する。
- [0057] 形状識別部 226 はまず拡大撮像処理で撮像した画像に対して予め準備したパッチ画像とのマッチングを行う。マッチング結果としては、拡大撮像処理で撮像した画像とパッチ画像との、濃淡で表現された距離画像が得られる。そして、形状識別部 226 はその距離画像を所定の閾値を用いて二値化処理を実行する。マッチングの手法としては、例えばテンプレートマッチングやヒストグラムマッチングなどが挙げられ、判定対象の画像、すなわち拡大撮像処理で撮像した画像をパッチ画像によりラスタスキャンして双方の距離を算出する。パッチ画像を多数準備する場合はマッチング結果の距離画像を積算する。なお、拡大撮像処理で撮像した画像内に複数個の細胞塊が存在する場合でも、形状識別部 226 は各々の細胞塊を別個のものとして識別できる。
- [0058] 続いて、形状識別部 226 は二値化処理された画像において、例えばエッジ抽出フィルタによる輪郭抽出と 8 連結探索による輪郭追跡を実行して輪郭を検出する。輪郭抽出の際のエッジ抽出フィルタとしては、例えば微分フィルタやプリューウィットフィルタ、ソーベルフィルタ、Canny Edge Detector などを用いることができる。輪郭追跡では輪郭の追跡開始点から一方向に順次輪郭点を追跡していくことで輪郭線を抽出でき、4 連結探索を用いることもできる。

[0059] そして、形状識別部 226 は輪郭検出結果から円や楕円、矩形などの所定形状を検出する。輪郭やエッジから円を検出する手法としてはハフ変換などを用いることができる。輪郭やエッジから楕円を検出する手法としては一般化ハフ変換や最小二乗推定によって輪郭の点列に楕円をフィットさせる手法などを用いることができる。輪郭やエッジから矩形を検出する手法としては輪郭の点列を全て包含するように矩形をフィットさせる手法などを用いることができる。このようにして、形状識別部 226 は拡大撮像処理で撮像した画像から細胞塊の輪郭抽出し、形状を識別する。

[0060] 形状判定部 227 は形状識別部 226 で識別された細胞塊の形状が所定形状であるか否かを判定する。「所定形状」は細胞塊の予め設定した形状であり、観察するに好適に成育し続ける可能性が高いと判断することができる程度の形状であってできるだけ円形に近いものが良い。

[0061] 細胞塊の所定形状の判定条件としては形状のほか、例えば大きさや凹凸度合いといった条件を加味しても良い。形状の判定条件としては、例えば輪郭を囲む楕円の楕円形度、輪郭を囲む円の真円度などが挙げられる。大きさの判定条件としては、例えば白色画素塊の大きさ、白色画素塊の輪郭の長さ、白色画素塊の輪郭内部の面積、楕円の長軸長さ、楕円の短軸長さ、楕円の円周の長さ、円の直径、円周の長さ、輪郭を囲む矩形の長さ、輪郭を囲む矩形の面積などが挙げられる。凹凸度合い判定条件としては、例えば輪郭の面積と周囲長との比、輪郭の面積と輪郭を囲む矩形の面積との比、輪郭の長さと輪郭を囲む矩形の長さとの比、輪郭のコーナー数、輪郭の面積と輪郭を囲む円或いは楕円の面積との比、輪郭の長さと輪郭を囲む円の円周或いは楕円の円周の長さとの比、輪郭を囲む矩形の面積と輪郭を囲む円或いは楕円の面積との比、輪郭を囲む矩形の長さと輪郭を囲む円或いは楕円の長さとの比などが挙げられる。輪郭のコーナー数で判定する際のコーナー検出手法としては、例えばハリスのコーナー検出や SUSAN オペレータなどを用いることができる。

[0062] ここでは、細胞塊の所定形状の判定条件を例えば楕円形度にして 1.1 以

下と設定し、記憶部 210 などに記憶している。なお、楕円形度は楕円の短軸長さに対する長軸長さの比である。これにより、できるだけ円形に近い細胞塊が識別されるので、観察を続けるのに適正な形状の細胞塊を自動的に選別することができる。したがって、成育過程で歪な形状に成育した細胞塊の観察順位を低くしたり、観察を中止したりすることができ、適正な形状の細胞塊の観察をより一層効率良く進めることが可能になる。

[0063] また、形状判定を閾値（例えば楕円形度 1.1）によって明示的に行う方法だけでなく、判定結果の優劣に基づいて細胞塊画像をソートしてモニタ 204a に表示（楕円形度なら、楕円形度が小さい順に表示）し、どの細胞塊までを好適と判定するかをユーザに委ねるような方法でも良い。

[0064] 記憶部 210 は細胞の観察や観察システム S の動作に関する様々なデータを記憶するためのものであって、例えば観察タイミング保持部 211、観察位置保持部 212、位置更新可否保持部 213、閾値保持部 214、形状保持部 215、及び観察画像保持部 216 を備えている。

[0065] 観察タイミング保持部 211 は観察に係る期間や日数、期限などといった日時に関する様々なデータを保持する。例えば、拡大観察対象細胞塊の識別を実行するタイミングについて設定した細胞塊の識別に関する所定期間である「所定識別期間」、拡大観察対象細胞塊の識別を終了するタイミングについて設定した所定日数である「所定識別日数」、拡大した細胞塊の撮像を実行するタイミングについて設定した拡大画像の撮像に関する所定期間である「所定撮像期間」、細胞の観察を終了するタイミングについての予め設定した所定期限である「所定観察期限」などといったデータである。これらのデータは観察プログラム 220 において適宜判定条件として使用され、計時部 202 で計測される日時と比較される。

[0066] 観察位置保持部 212 は全体観察によって得られた細胞塊の観察位置（座標）や、手動で設定した観察位置（座標）といったデータを保持する。

[0067] 位置更新可否保持部 213 は観察タイミング保持部 211 に記憶された所定識別期間に応じて、前回の全体観察時に得て観察位置保持部 212 に記憶

された細胞塊の観察位置を更新するか否かのフラグを保持する。

[0068] 閾値保持部 2 1 4 は観察に係る閾値に関する様々なデータを保持する。例えば、二値化処理の際に白色画素か黒色画素かを判定するための閾値、ラベリングされた白色画素塊を細胞塊として抽出するか否かを判定するための画素数についての閾値などといったデータである。

[0069] また、閾値保持部 2 1 4 は形状識別処理実行の際、好適に成育し得る細胞塊を識別するための閾値を保持する。例えば、白色画素塊の大きさで判定するための画素数の閾値、白色画素塊の輪郭の長さで判定するための輪郭の長さの閾値、白色画素塊の輪郭内部の面積で判定するための面積の閾値、輪郭を囲む円の真円度で判定するための真円度の閾値、輪郭を囲む楕円の楕円形で判定するための楕円長軸と楕円短軸の比の閾値、円の直径で判定するための直径の閾値、円周の長さで判定するための円周の閾値、楕円の長軸長さで判定するための長軸の閾値、楕円の短軸長さで判定するための短軸の閾値、楕円の円周の長さで判定するための楕円円周の閾値、輪郭を囲む矩形の長さで判定するための矩形の長さの閾値、輪郭を囲む矩形の面積で判定するための矩形の面積の閾値、輪郭の面積と周囲長との比で判定するための輪郭の面積と周囲長との比の閾値、輪郭の面積と輪郭を囲む矩形の面積との比で判定するための面積比の閾値、輪郭の長さと輪郭を囲む矩形の長さとの比で判定するための長さ比の閾値、輪郭のコーナー数で判定するためのコーナー数の閾値、輪郭の面積と輪郭を囲む円或いは楕円の面積との比で判定するための面積比の閾値、輪郭の長さと輪郭を囲む円或いは楕円の長さとの比で判定するための長さ比の閾値、輪郭を囲む矩形の面積と輪郭を囲む円或いは楕円の面積との比で判定するための面積比の閾値、輪郭を囲む矩形の長さと輪郭を囲む円或いは楕円の長さとの比で判定するための長さ比の閾値などといったデータである。

[0070] 形状保持部 2 1 5 は形状識別処理の全ての方法について、細胞塊の形状識別処理結果を保持する。

[0071] 観察画像保持部 2 1 6 は拡大観察画像、全体観察画像を保持する。

- [0072] なお、観察タイミング保持部 2 1 1 や閾値保持部 2 1 4 は観察プログラム 2 2 0 に関する諸設定をユーザが適宜変更できる設定部としても機能する。観察タイミング保持部 2 1 1 を用いて設定可能な事項としては、例えば全体観察部 1 0 や拡大観察部 2 0 において画像を撮像するタイミングや、観察に係る期間や日数、期限などといった設定事項である。閾値保持部 2 1 4 を用いて設定可能な事項としては、例えば拡大観察対象細胞塊の判定基準である細胞塊の所定サイズ、細胞塊が観察を続けるのに適正な形状であるか否かの判定基準である細胞塊の所定形状などといった設定事項である。
- [0073] 計時部 2 0 2 は細胞の観察開始からの日時や観察システム S の動作制御に関する時間を計測するためのものであって、各種時間を把握できる。
- [0074] 入力部 2 0 3 は、例えばキーボード 2 0 3 a やマウス 2 0 3 b などのポインティングデバイスで構成されている。ユーザはキーボード 2 0 3 a を用いて文字や数値などの入力を行う。また、ユーザはマウス 2 0 3 b を用いて出力部 2 0 4 のモニタ 2 0 4 a の画面上でカーソルを任意の方向に移動させ、メニューやその他選択肢の選択を行う。演算部 2 0 1 は入力部 2 0 3 から得られる情報に基づき演算部 2 0 1 や記憶部 2 1 0 に記憶、入力されたプログラム、データ、ファイルに対して各種処理を実行したり、出力部 2 0 4 に対して出力処理を実行したりする。
- [0075] 出力部 2 0 4 は、例えば液晶ディスプレイ、CRT 等のモニタ 2 0 4 a やスピーカ 2 0 4 b で構成されている。演算部 2 0 1 は実行されるプログラムの処理に基づいてモニタ 2 0 4 a にウィンドウやアイコン、メニューなどを表示させたり、スピーカ 2 0 4 b から発音させたりする。また、演算部 2 0 1 は入力部 2 0 3 からの情報に基づいてモニタ 2 0 4 a にユーザが入力した文字や数値などを表示させ、ユーザが移動させるカーソルを表示させる。
- [0076] 続いて、容器 C 内の細胞の観察に係るユーザによる観察システム S の操作について、図 6 に示すフローに沿って説明する。図 6 は観察システム S の操作に係るフローを示す説明図である。
- [0077] ユーザは最初に観察装置 1、制御装置 1 0 0、及びコンピュータ 2 0 0 の

電源をオンにして観察システムSを起動させる（図6のステップ#101）。そして、ユーザは搬送部30のホルダ31に細胞と細胞の培養液とが入った容器Cをセットする（ステップ#102）。続いて、ユーザはコンピュータ200において観察プログラム220を起動させると（ステップ#103）、モニタ204a上に操作画面が表示される。

[0078] 観察プログラム220はプログラムの起動と連動して自動的に、搬送部30の原点復帰動作を実行するようになっている（ステップ#104）。そして、観察プログラム220はカメラによる撮像を開始し（ステップ#105）、モニタ204aにカメラからのリアルタイム画像を表示させる。

[0079] 続いて、ユーザはモード設定操作を実行する（ステップ#106）。このモード設定操作では通常タイムラプス探索操作（ステップ#107）と、全体観察操作（ステップ#108）とが選択できる。タイムラプス観察とは所定期間ごとに予め設定された位置を観察する手法である。

[0080] 通常タイムラプス探索操作（ステップ#107）ではユーザがモニタ204a上やキーボード203aの矢印キーで容器Cを移動させながら容器C内を観察し、目標の細胞を確認する。そして、キャプチャ画像の取得や表示、保存、さらに座標設定、座標保存などを実行する。

[0081] 全体観察操作（ステップ#108）ではユーザが全体観察における所定識別期間や所定識別日数の設定を行う。画像の取得や表示、保存、さらに観察位置表示などは設定に基づき自動的に実行される。

[0082] 次に、目的別操作（ステップ#109）では終了（ステップ#110）、目視継続（ステップ#111）、及びタイムラプス（ステップ#112）の操作が選択できる。

[0083] 終了（ステップ#110）を選択すると、カメラによる撮像が停止され、設定が保存される。目視継続（ステップ#111）を選択すると、カメラによって撮像された画像の手動によるキャプチャ保存が可能である。

[0084] タイムラプス（ステップ#112）を選択すると、さらにタイムラプス観察開始、タイムラプス一時停止、及びタイムラプス再開の操作が可能である

。タイムラプスを一時停止させた場合、容器Cの取り出しや培養液の交換といった作業が可能である（ステップ# 1 1 3）。

[0085] このような観察プログラム220を用いてタイムラプス観察を実行すると、全体撮像処理で撮像した画像から発現した細胞塊を識別してその位置を特定し、さらに拡大撮像処理で撮像した画像から細胞塊の形状識別して観察を続けるのに適正な形状の細胞塊を選別するといった一連の処理を自動的に行うことが可能である。

[0086] 続いて、観察システムSにおける観察処理に係る動作について、図7に示すフローに沿って説明する。図7は観察システムSにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。

[0087] 観察プログラム220を実行させると（図7のスタート）、観察プログラム220はまず所定識別期間に合致しているか否かを判定する（ステップ# 201）。なおこれに関して、観察プログラム220は計時部202に対して播種後、例えば細胞の観察開始からの日時と、拡大観察部20を用いた前回の拡大観察対象細胞塊の識別からの期間とを予め計測させている。そして、所定識別期間は拡大観察対象細胞塊の識別を実行するタイミングについての予め設定した期間であり、例えば1日と設定され記憶部210の観察タイミング保持部211に記憶されている。所定識別期間は適宜設定することが可能である。

[0088] ステップ# 201において所定識別期間に合致していない場合（ステップ# 201のNo）、観察プログラム220は拡大観察部20に拡大画像を撮像させ（ステップ# 202）、観察処理に係る動作についての一連のフローを終了する（図7のエンド）。

[0089] 一方、ステップ# 201において所定識別期間に合致している場合（ステップ# 201のYes）、観察プログラム220は観察装置1の全体観察部10に指令を送り容器C全体を撮像することで細胞の画像を撮像させる（ステップ# 203）。次に、観察プログラム220は撮像された全体画像の細胞塊でない部分と細胞塊の部分とを所定の閾値を用いて区別する二値化処理

を実行する（ステップ# 204）。これにより、細胞塊でない部分が黒に細胞塊の部分が白に二値化される。

[0090] さらに、観察プログラム220は収縮膨張処理を実行する（ステップ# 205）。収縮膨張処理とは黒色画素に接する白色画素を剥ぎ取る処理である収縮処理、それとは逆に黒色画素に接する白色画素を加える処理である膨張処理からなる。収縮処理では微小な白色画素の塊を黒色画素に反転し、膨張処理では白色画素領域内に存在する微小な黒色画素の塊を白色画素に反転できるため、ノイズを除去する効果がある。

[0091] そして、観察プログラム220はラベリング処理を実行し（ステップ# 206）、任意位置の予め定めた小領域ごとに白色の画素数を算出し、白色画素の塊、すなわち細胞塊を識別する。さらに、観察プログラム220は識別された細胞塊、すなわち白色画素の塊のうち、画素数の多いものから順にソートを実行する（ステップ# 207）。

[0092] 次に、観察プログラム220は最大の白色画素の塊（細胞塊）のサイズが閾値、すなわち所定サイズ以上か否かを判定する（ステップ# 208）。この閾値としての所定サイズは、例えば画素数にして1000ピクセルと設定し、記憶部210の閾値保持部214に記憶している。最大の細胞塊が所定サイズ未満である場合（ステップ# 208のNo）、観察プログラム220は全体観察部10が撮像した全体画像の任意の座標を検出して拡大観察位置としてセットし（ステップ# 209）、拡大観察部20に拡大画像を撮像させる（ステップ# 202）。そして、観察プログラム220は観察処理に係る動作についての一連のフローを終了する（図7のエンド）。

[0093] 一方、ステップ# 208において最大の細胞塊が所定サイズ以上である場合（ステップ# 208のYes）、観察プログラム220は再度選択した細胞塊が所定サイズ以上であるか否かを判定する（ステップ# 210）。細胞塊が所定サイズ以上である場合（ステップ# 210のYes）、観察プログラム220は白色画素の塊（細胞塊）を拡大観察対象細胞塊として認識してその中心座標を検出する（ステップ# 211）。さらに、観察プログラム2

20はその中心座標を拡大画像観察用に座標変換する（ステップ#212）。

[0094] 次に、観察プログラム220は座標変換した細胞塊の中心座標を拡大観察位置としてセットし（ステップ#213）、拡大観察部20に拡大画像を撮像させる（ステップ#214）。そして、観察プログラム220は次の白色画素の塊（細胞塊）を拡大観察対象細胞塊であるか否かの判定対象として選択し（ステップ#215）、ステップ#210に戻って選択した細胞塊が所定サイズ以上であるか否かを判定する。

[0095] ステップ#206で識別された細胞塊が所定サイズ未満となるまで（ステップ#210のNo）、ステップ#210～ステップ#215までのフローが繰り返され、拡大観察対象として認識された細胞塊の拡大観察位置のセットが続けられる。ステップ#206で識別された細胞塊が所定サイズ未満となると（ステップ#210のNo）、観察プログラム220は観察処理に係る動作についての一連のフローを終了する（図7のエンド）。

[0096] そして、タイムラプス観察では拡大観察対象となる細胞塊の位置をユーザが手動で設定するか、全体観察結果から細胞塊の位置設定（位置特定）を行う。位置が特定された細胞塊に対して、観察プログラム220は所定撮像期間ごとに拡大観察部20に指令を送り容器C内を拡大してその細胞の画像を撮像させ、所定観察期限に到達したことを条件として撮像を中止する。

[0097] なお、所定観察期限は細胞の観察を終了するタイミングについての予め設定した期限であり、例えば10日と設定され観察タイミング保持部211に記憶されている。所定観察期限は適宜設定することが可能である。

[0098] このようにして、容器C全体を撮像した画像から細胞塊が識別されてその座標が検出され、検出された座標を中心に拡大することでその細胞塊の詳細を観察することが可能になる。また、所定撮像期間ごとに拡大された細胞の画像が撮像され、観察期限に到達したことでその撮像が終了されるので、細胞塊の発現のときから成育完了まで継続してタイムラプス観察を行うことが可能になる。

[0099] 本発明の実施形態の構成によれば、容器C内で培養中の細胞を観察するにあたって、容器C全体を観察して発現した細胞塊を特定でき、さらにこの特定した細胞塊を拡大して詳細を観察することが可能な観察装置1を提供することができる。また、このような特定した細胞塊の発現のときから成育完了まで継続して観察を行うことが可能な観察プログラム220、観察方法及び観察システムSを提供することができる。

[0100] (第2の実施形態)

次に、本発明の第2の実施形態に係る観察プログラムについて、その観察処理に係る動作を図8に示すフローに沿って説明する。図8は観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートである。なお、この実施形態の基本的な構成は図1～図7を用いて説明した前記第1の実施形態と同じであるので、第1の実施形態と共通する構成要素については図面の記載及びその説明を省略するものとする。

[0101] 第2の実施形態に係る観察プログラム220を実行させると(図8のスタート)、観察プログラム220はまず所定識別期間に合致しているか否かを判定する(ステップ#301)。所定識別期間に合致している場合(ステップ#301のYes)、観察プログラム220は観察装置1の全体観察部10に指令を送り容器C全体を撮像することで細胞の画像を撮像させる(ステップ#303)。

[0102] 次に、観察プログラム220は容器Cに細胞を播種後、所定識別日数が経過したか否かを判定する(ステップ#304)。なおこれに関して、観察プログラム220は計時部202に対して播種後、例えば細胞の観察開始からの日時を予め計測させている。そして、所定識別日数は拡大観察対象細胞塊の識別を終了するタイミングについての予め設定した日数であり、例えば5日と設定され記憶部210の観察タイミング保持部211に記憶されている。

[0103] ステップ#304において播種後、例えば細胞の観察開始からの日時が所定識別日数である5日を経過している場合(ステップ#304のYes)、

観察プログラム 220 は拡大観察部 20 に拡大画像を撮像させ（ステップ # 302）、観察処理に係る動作についての一連のフローを終了する（図 8 のエンド）。すなわち、観察開始から 5 日を経過すると、拡大観察対象となる細胞塊の識別を中止してその位置情報を更新しない。

[0104] ステップ # 304 において播種後、例えば細胞の観察開始からの日時が所定識別日数である 5 日を経過していない場合（ステップ # 304 の No）、観察プログラム 220 は撮像された全体画像の細胞塊でない部分と細胞塊の部分とを所定の閾値を用いて区別する二値化処理を実行する（ステップ # 305）。以下、ステップ # 305～ステップ # 316 の動作フローは第 1 の実施形態のステップ # 204～ステップ # 215 の動作フローと同じであるので、説明を省略する。

[0105] そして、タイムラプス観察では所定識別期間ごとに拡大観察対象細胞塊を認識できるまで上記の拡大観察対象細胞塊の識別を繰り返し、且つ所定識別日数（5 日）を経過したことを条件として拡大観察対象細胞塊の識別を中止する。所定識別期間は計時部 202 で計測される拡大観察対象細胞塊の識別を実行するタイミングについての予め設定した期間であり、例えば 1 日と設定され記憶部 210 の観察タイミング保持部 211 に記憶されている。所定識別期間及び所定識別日数は適宜設定することが可能である。

[0106] このようにして、拡大観察対象細胞塊を認識する、すなわち細胞塊の発現のときを見極められるまで所定識別期間（1 日）ごとに拡大観察対象細胞塊の識別を繰り返すので、自動的に細胞塊の発現のときを見極められる。そして、細胞の観察開始から所定識別日数（5 日）経過後は拡大観察対象細胞塊の識別が中止されるので、全体観察で特定した細胞塊の拡大観察のみが実行されて成育完了まで観察を効率良く進めることができる。

[0107] なお、拡大観察対象細胞塊の識別を継続するか否かの判定はステップ # 304 のように日数に基づき自動的に実行させる方法のほか、ユーザが自由に設定できるようなウィンドウやユーザインターフェースを設け、拡大観察対象細胞塊の識別を継続するか否かの判定をユーザに委ねる方法にしても良い

。

[0108] (第3の実施形態)

次に、本発明の第3の実施形態に係る観察プログラムについて、その観察処理に係る動作を図9及び図10に示すフローに沿って説明する。図9は観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャート、図10は図9に示す観察処理に係る動作を示すフローチャートの続きである。なお、この実施形態の基本的な構成は前記第1及び第2の実施形態と同じであるので、これらの実施形態と共通する構成要素については図面の記載及びその説明を省略するものとする。

[0109] 第3の実施形態において、図9の動作フローのステップ#401～ステップ#410及び図10の動作フローのステップ#411～ステップ#413は図7及び図8の動作フローと同じであるので、説明を省略する。

[0110] 観察プログラム220は図10のステップ#413で拡大観察用に座標変換した細胞塊の中心座標を拡大観察位置として仮セットする(ステップ#414)。そして、観察プログラム220は拡大観察部20に指令を送り容器C内の拡大観察位置に関して拡大して細胞の画像を撮像させる(ステップ#415)。

[0111] 続いて、観察プログラム220は拡大撮像処理で撮像された画像から細胞塊の輪郭を抽出し(ステップ#416)、形状を識別する(ステップ#417)。そして、観察プログラム220は識別された細胞塊の形状が所定形状、すなわち楕円形度の閾値以下であるか否かを判定する(ステップ#418)。この所定形状を示す楕円形度の閾値としては、例えば1.1と設定され記憶部210の閾値保持部214に記憶されている。細胞塊の所定形状を示す楕円形度の閾値は適宜設定することが可能である。また、楕円形度に代わる細胞塊の所定形状の判定条件、例えば真円度を設定することも可能である。

。

[0112] ステップ#418において細胞塊の楕円形度が閾値以下である場合(ステップ#418のYes)、観察プログラム220は細胞塊の中心座標を拡大

観察位置として正式にセットする（ステップ# 4 1 9）。一方、細胞塊の楕円形度が閾値を超えている場合（ステップ# 4 1 8のNo）、観察プログラム220は仮セットした拡大観察位置を消去する（ステップ# 4 2 0）。そして、観察プログラム220は次の白色画素の塊（細胞塊）を拡大観察対象細胞塊であるか否かの判定対象として選択し（ステップ# 4 2 1）、ステップ# 4 1 1に戻って選択した細胞塊が所定サイズ以上であるか否かを判定する。

[0113] このようにして、所定形状の細胞塊が識別されるので、観察を続けるのに適正な形状の細胞塊を自動的に選別することができる。その結果、成育過程で歪な形状に成育した細胞塊の観察を中止することができ、適正な形状の細胞塊の観察をより一層効率良く進めることが可能になる。

[0114] なお、ステップ# 4 1 8の細胞塊の形状判定は閾値（例えば楕円形度1.1）によって明示的に行う方法だけでなく、判定結果の優劣に基づいて細胞塊画像をソートしてモニタ204aに表示（楕円形度なら、楕円形度が小さい順に表示）し、どの細胞塊までを好適と判定するかをユーザに委ねるような方法でも良い。

[0115] （第4の実施形態）

次に、本発明の第4の実施形態に係る観察プログラムについて、その観察処理に係る動作を図11に示すフローに沿って、図12～図21を適宜参照しつつ説明する。なお、この実施形態の基本的な構成は前記第1～第3の実施形態と同じであるので、これらの実施形態と共通する構成要素については図面の記載及びその説明を省略するものとする。

[0116] i P S細胞の維持培養では、中央部や周辺部で細胞群の状態が変化（分化）してしまった分化コロニーを取り除き、未分化コロニーのみを継続的に培養する。例えば、図12に示す未分化コロニーは、未分化領域のみで構成されているのに対して、図13に示す分化コロニー（以下、分化コロニー1と称する）では、コロニーの中央部に分化領域が発生している。そこで、本実施形態の観察プログラムは、未分化コロニーに対しては、観察を続けるのに

適正な形状の細胞塊として選別して拡大観察の対象とし、分化コロニーに対しては、拡大観察を行わない。

[0117] 図 11 は観察プログラムにおける観察処理に係る動作を示すフローチャートであって、図 9 に示す観察処理に係る動作を示すフローチャートの続きである。したがって、本実施形態の観察プログラムは、図 9 の動作フローのステップ # 401 ～ステップ # 410 と、図 11 の動作フローのステップ # 511 ～ステップ # 522 とからなる。なお、第 3 の実施形態と共通する、図 9 の動作フローのステップ # 401 ～ステップ # 410 は、説明を省略する。

[0118] ステップ # 511 において、第 1 の実施形態のステップ # 210 と同様に、観察プログラム 220 は、選択した細胞塊が所定サイズ以上であるか否かを判定する。細胞塊が所定サイズ以上である場合（ステップ # 511 の Yes）、観察プログラム 220 は、例えば前述したエッジ抽出フィルタによる輪郭抽出と 8 連結探索による輪郭追跡などを実行して、細胞塊の輪郭を抽出する（ステップ # 512）。また、観察プログラム 220 は、例えば前述したハフ変換や一般化ハフ変換などを用いて、抽出した輪郭の図形から円または楕円を検出し（ステップ # 513）、さらにその中心を検出する（ステップ # 514）。

[0119] ここで、図 12 に示した未分化コロニーの画像に対して、二値化処理および収縮膨張処理（図 9 のステップ # 405 およびステップ # 406）を行った結果の一例を図 14 に示す。図 14 においては、白色画素の塊が楕円形状となっている。一方、図 13 に示した分化コロニー 1 の画像に対して、二値化処理および収縮膨張処理を行った結果の一例を図 15 に示す。図 15 においては、楕円形状の白色画素の塊がそれより小さな楕円形状の黒色画素の塊を内包している。

[0120] また、これらの白色画素の塊に対して、ステップ # 512 の輪郭抽出を行った結果の一例を、それぞれ図 16 および図 17 において実線で示す。さらに、これらの輪郭の図形に対して、ステップ # 513 の円・楕円検出を行っ

た結果の一例を、それぞれ図 1 6 および図 1 7 において破線で示す。そして、これらの橢円に対して、ステップ # 5 1 4 の円・橢円中心検出を行った結果の一例を、それぞれ図 1 6 および図 1 7 において記号「+」で示す。

[0121] ステップ # 5 1 3 の円・橢円検出の結果、未分化コロニーに対しては、図 1 6 に示すように、1 つの円または橢円のみが検出されている。一方、分化コロニー 1 に対しては、図 1 7 に示すように、2 つの円または橢円が検出されているが、これらは、一方が他方を内包する、所謂ドーナツ形状となっている。なお、所謂ドーナツ形状には、一方の円または橢円に他方の円または橢円が内接する場合を含めてもよい。

[0122] 続いて、観察プログラム 2 2 0 は、ステップ # 5 1 2 ~ ステップ # 5 1 4 で抽出した円または橢円の形状情報に基づいて、細胞塊の状態を判定する（ステップ # 5 1 5 およびステップ # 5 1 6）。

[0123] 具体的には、円または橢円を複数検出した場合に、それらのうち 2 つの中心間が所定の距離以下であるとき（ステップ # 5 1 5 の Y e s）に、分化コロニー（所定状態）であると判定する。なお、輪郭線が 2 重に抽出されるなどして、未分化コロニーであっても略同じ位置を中心とする複数の円または橢円が検出される場合もある。そのため、本実施形態では、2 つの円または橢円の中心間が所定の距離以下であり（ステップ # 5 1 5 の Y e s）、かつ、それらの半径の差が所定以上であるとき（ステップ # 5 1 6 の Y e s）に、分化コロニーであると判定している。

[0124] ここで、2 つの円または橢円の中心間の距離の閾値 T_d と半径の差の閾値 T_r とを等しくすると、 $(\text{中心間の距離}) \leq T_d = T_r \leq (\text{半径の差})$ である場合、すなわち、2 つの円または橢円が内包または内接する所謂ドーナツ形状である場合に、分化コロニーであると判定される。なお、 T_d を T_r より小さくすることによって、所謂ドーナツ形状の検出基準を厳しくし、2 つの円または橢円的一方が他方を内包する場合にのみ分化コロニーであると判定することもできる。反対に、全体撮像処理で撮像した画像を用いていることを考慮して、 T_d を T_r より若干大きくすることによって、所謂ドーナツ

形状の検出基準を緩くし、2つの円または楕円が若干交わる場合を含めて分化コロニーであると判定することもできる。

[0125] 一方、1つの円または楕円のみを検出した場合（ステップ#515のNo）や、中心間がすべて所定の距離より大きい場合（ステップ#515のNo）、半径の差がすべて所定未満である場合（ステップ#516のNo）には、未分化コロニーであると判定する。

[0126] そして、観察プログラム220は、未分化コロニーであると判定した場合には、当該白色画素の塊（細胞塊）を拡大観察対象細胞塊として選択し、以下、第3の実施形態のステップ#412～ステップ#415、ステップ#419、ステップ#421と同じ動作フローとなる（ステップ#517～ステップ#522）。一方、分化コロニーであると判定した場合には、拡大観察対象細胞塊として選択せず、次の白色画素の塊（細胞塊）を拡大観察対象細胞塊であるか否かの判定対象として選択し（ステップ#522）、ステップ#511に戻って選択した細胞塊が所定サイズ以上であるか否かを判定する。

[0127] このようにして、分化コロニーが所定形状（所謂ドーナツ形状）として検出されるので、未分化コロニーを、観察を続けるのに適正な形状の細胞塊として自動的に選別することができる。その結果、分化コロニーに対しては、拡大観察を行わず、未分化コロニーの観察をより一層効率良く進めることが可能となる。

[0128] なお、例えば、図18に示す分化コロニー（以下、分化コロニー2と称する）では、コロニーの周辺部に分化領域が発生しており、二値化処理を行った場合、中央部の未分化領域のみで構成される白色画素の塊となってしまう。分化コロニー2に対しても拡大観察の対象としないためには、例えば、二値化処理の代わりに三値化処理や四値化処理などを行えばよい。

[0129] 一例として、図18に示した分化コロニー2の画像に対して、図19に示すように各画素の輝度の度数分布を求めて三値化処理を行った結果を図20に示す。また、ステップ#512において、白色画素およびグレー画素の塊

に対してそれぞれ輪郭抽出を行い、さらに、ステップ# 5 1 3の円・楕円検出およびステップ# 5 1 4の円・楕円中心検出を行った結果の一例を図2 1に示す。そして、観察プログラム2 2 0は、このように抽出した円または楕円の形状情報に基づいて、細胞塊の状態を判定することができる（ステップ# 5 1 5およびステップ# 5 1 6）。

[0130] また、本実施形態では、分化コロニーを、拡大観察を行わない所定状態としたが、図2 2に示すように、所定状態（ステップ# 5 1 5のY e sかつステップ# 5 1 6のY e s）を拡大観察の対象としてもよい。この場合、未分化コロニーに対しては拡大観察を行わず、分化コロニー（所定状態）のみを効率的に観察することができる。

[0131] 前述したように、第4の実施形態に係る観察プログラムにおいて、ステップ# 4 0 3の全体撮像処理で撮像した画像から識別した細胞塊の形状情報を抽出し、当該形状情報に基づいて細胞塊の状態を判定することによって、未分化コロニーを、観察を続けるのに適正な形状の細胞塊として自動的に選別し、分化コロニーの観察順位を低くしたり、観察を中止したりすることができる。なお、分化コロニーを、観察を続けるのに適正な形状の細胞塊として選別することもできる。

[0132] また、形状情報に基づく細胞塊の状態の判定結果に基づいて、拡大観察対象細胞塊を選択することによって、分化コロニーに対しては、拡大観察を行わず、未分化コロニーの観察をより一層効率良く進めることができる。なお、分化コロニーを拡大観察の対象とすることもできる。

[0133] また、細胞塊の輪郭の図形から円または楕円を検出し、円または楕円を複数検出した場合に、それらのうち2つの中心間が所定の距離以下であるときに分化コロニーであると判定することによって、分化コロニーを所謂ドーナツ形状として検出することができる。

[0134] さらに、2つの円または楕円の中心間が所定の距離以下であり、かつ、それらの半径の差が所定以上であるときに分化コロニーであると判定することによって、より精度よく分化コロニーを所謂ドーナツ形状として検出するこ

とができる。

[0135] また、所定サイズ以上の細胞塊から拡大観察対象細胞塊を選択することによって、細胞塊の発現のときを見極めることができ、細胞塊の発現のときから成育完了まで継続して観察を行うことができる。

[0136] また、所定撮像期間ごとに観察処理を行い、所定観察期限に到達すると観察処理を終了することによって、細胞塊の発現のときから成育完了まで継続してタイムラプス観察を行うことができる。

[0137] また、前述したように、全体観察部 10 の撮像部である CMOS カメラ 12 によって容器 C 全体を撮像することで容器 C 内の細胞の画像を撮像することによって、観察プログラムを実行するコンピュータは、全体撮像処理で撮像した画像から識別した細胞塊の形状情報を抽出し、当該形状情報に基づいて細胞塊の状態を判定することができる。

[0138] また、形状情報に基づく細胞塊の状態の判定結果に基づいて、拡大観察対象細胞塊を選択することによって、拡大観察部 20 の撮像部である CCD カメラ 24 によって容器 C 内の一部の領域を拡大して拡大観察対象細胞塊を画像として撮像することができる。

[0139] なお、上記実施形態は、本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明を限定して解釈するためのものではない。本発明は、その趣旨を逸脱することなく、変更、改良され得るとともに、本発明にはその等価物も含まれる。

[0140] 例えば、上記実施形態では培養容器 1 枚を観察するという内容で説明したが、培養容器複数枚を載置できるトレイを用いて複数枚を同時に観察しても良い。

[0141] また、上記実施形態では全体観察部 10 の撮像部に CMOS カメラ 12 を、拡大観察部 20 の撮像部に CCD カメラ 24 を用いることとしたが、カメラの種類としては CMOS カメラ、CCD カメラいずれを用いても良い。

[0142] また、上記第 4 の実施形態において、ステップ # 518 に代えて、第 3 の実施形態のステップ # 416 ～ステップ # 420 とすることによって、第 3

および第4の実施形態の形状判定を組み合わせ用いても良い。

符号の説明

[0143]	S	観察システム
	1	観察装置
	2	本体（筐体）
	1 0	全体観察部
	1 1	レンズ（全体観察光学系）
	1 2	CMOSカメラ（撮像部）
	1 3	リング照明（全体観察照明）
	2 0	拡大観察部
	2 1	対物レンズ（拡大観察光学系、レンズ部）
	2 2	反射ミラー（拡大観察光学系）
	2 3	ズームレンズ（拡大観察光学系）
	2 4	CCDカメラ（撮像部）
	2 5	位相差照明部（拡大観察照明）
	2 6	対物レンズカバー（カバー部材）
	2 7	窓部
	3 0	搬送部
	1 0 0	制御装置
	2 0 0	コンピュータ
	2 0 1	演算部
	2 0 2	計時部
	2 1 0	記憶部
	2 1 1	観察タイミング保持部（設定部）
	2 1 4	閾値保持部（設定部）
	2 2 0	観察プログラム
	C	容器
	D	空隙

請求の範囲

- [請求項1] コンピュータに、
- 試料と溶液とが入った容器全体を撮像することで前記試料の画像を撮像する全体撮像処理と、
- 前記全体撮像処理で撮像した前記画像から複数の前記試料が寄り集まった試料塊を識別する試料塊識別処理と、
- 前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊の形状情報を抽出し、前記形状情報に基づいて前記試料塊の状態を判定する試料塊判定処理と、
- 、
- を実行させることを特徴とする観察プログラム。
- [請求項2] 前記試料塊判定処理の判定結果に基づいて、前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊から拡大観察対象試料塊を選択し、前記拡大観察対象試料塊の中心の座標を検出する座標検出処理と、
- 前記座標検出処理で検出した前記座標を中心として拡大して前記拡大観察対象試料塊の画像を撮像する拡大撮像処理と、
- をさらに実行させることを特徴とする請求項1に記載の観察プログラム。
- [請求項3] 前記試料塊判定処理は、
- 前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊の輪郭を抽出して、抽出した前記輪郭の図形から円または楕円を検出し、
- 前記円または楕円を複数検出した場合に、2つの前記円または楕円の中心間が所定の距離以下であるときに前記試料塊が所定状態であると判定し、
- 前記座標検出処理は、前記試料塊判定処理で前記所定状態であると判定した前記試料塊を前記拡大観察対象試料塊として選択しないことを特徴とする請求項2に記載の観察プログラム。
- [請求項4] 前記試料塊判定処理は、
- 前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊の輪郭を抽出して、抽出

した前記輪郭の図形から円または楕円を検出し、

前記円または楕円を複数検出した場合に、2つの前記円または楕円の中心間が所定の距離以下であるときに前記試料塊が所定状態であると判定し、

前記座標検出処理は、前記試料塊判定処理で前記所定状態であると判定した前記試料塊を前記拡大観察対象試料塊として選択することを特徴とする請求項2に記載の観察プログラム。

[請求項5] 前記試料塊判定処理は、

前記円または楕円を複数検出した場合に、2つの前記円または楕円の中心間が所定の距離以下であり、かつ、当該2つの前記円または楕円の半径の差が所定以上であるときに前記試料塊が前記所定状態であると判定することを特徴とする請求項3または請求項4に記載の観察プログラム。

[請求項6] 前記座標検出処理は、前記試料塊判定処理の判定結果に基づいて、前記試料塊識別処理で識別した前記試料塊のうち所定サイズ以上の前記試料塊から前記拡大観察対象試料塊を選択することを特徴とする請求項2ないし請求項5の何れかに記載の観察プログラム。

[請求項7] 前記試料の観察開始からの日時を計測する計時処理をさらに実行させ、

前記試料塊識別処理は、前記計時処理で計時した試料塊の識別に関する所定期間ごとに前記試料塊の識別を繰り返し、かつ、所定日数を経過したことを条件として前記試料塊の識別を中止することを特徴とする請求項6に記載の観察プログラム。

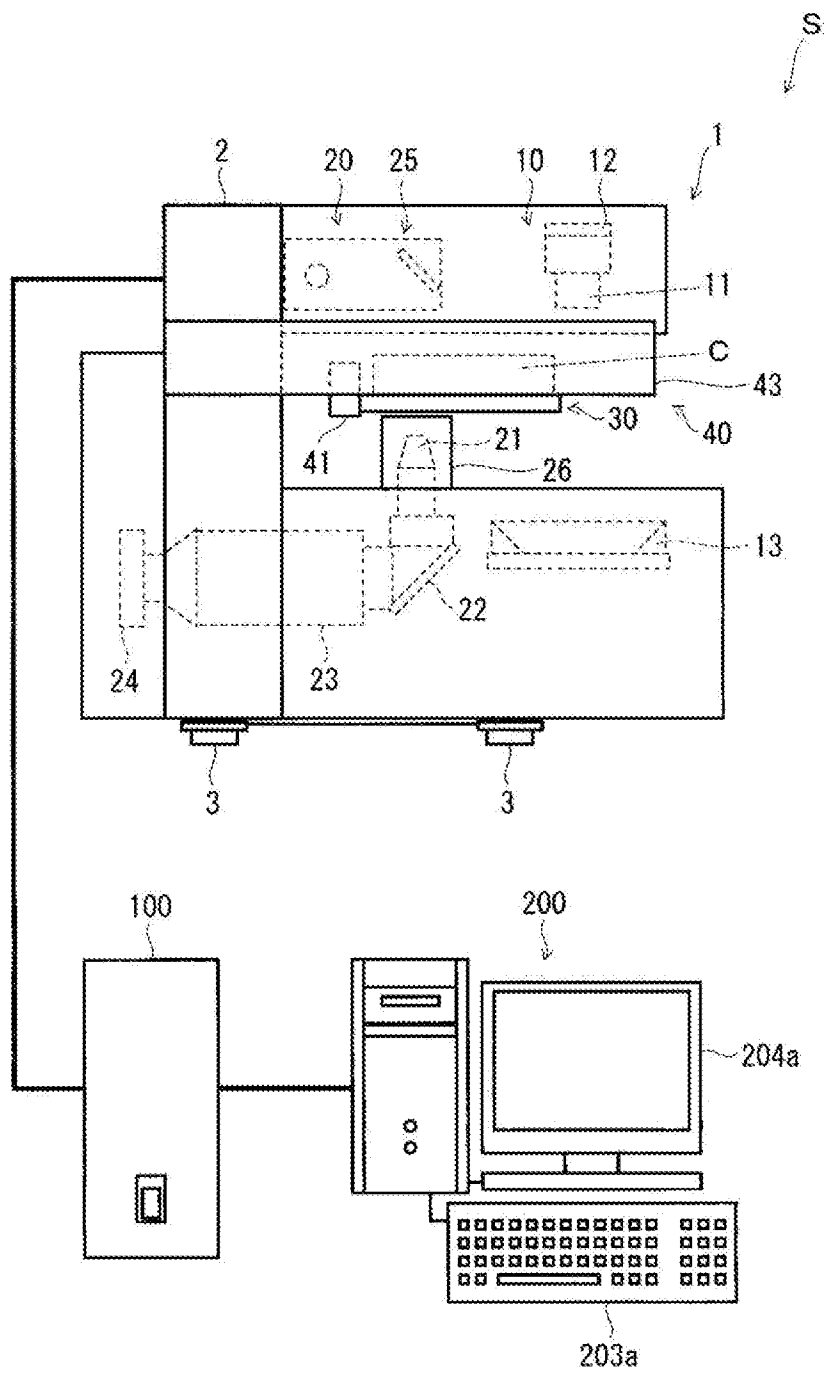
[請求項8] 請求項1ないし請求項7の何れかに記載の観察プログラムを実行するコンピュータと、

前記容器全体を撮像することで前記容器内の前記試料を画像として撮像する撮像部と、

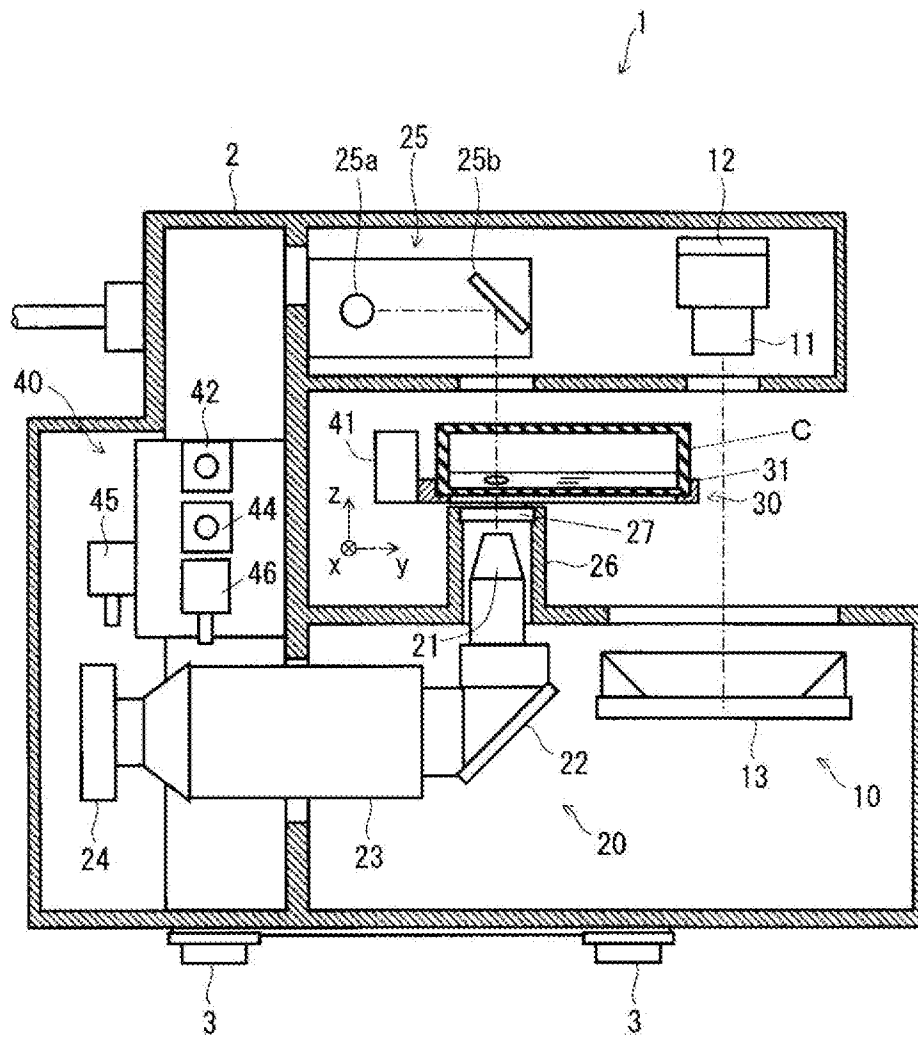
を備えることを特徴とする観察装置。

- [請求項9] 請求項2ないし請求項7の何れかに記載の観察プログラムを実行するコンピュータと、
- 前記容器全体を撮像することで前記容器内の前記試料を画像として撮像する第1の撮像部と、
- 前記座標検出処理で検出した前記座標を中心として拡大して前記容器内の前記試料を画像として撮像する第2の撮像部と、
- を備えることを特徴とする観察装置。

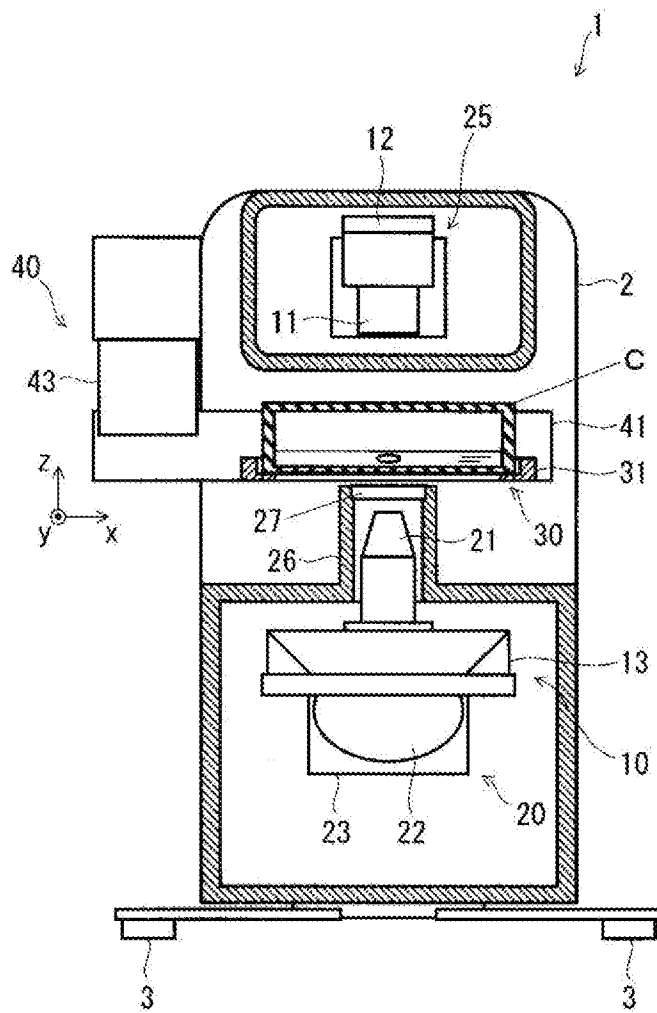
[図1]



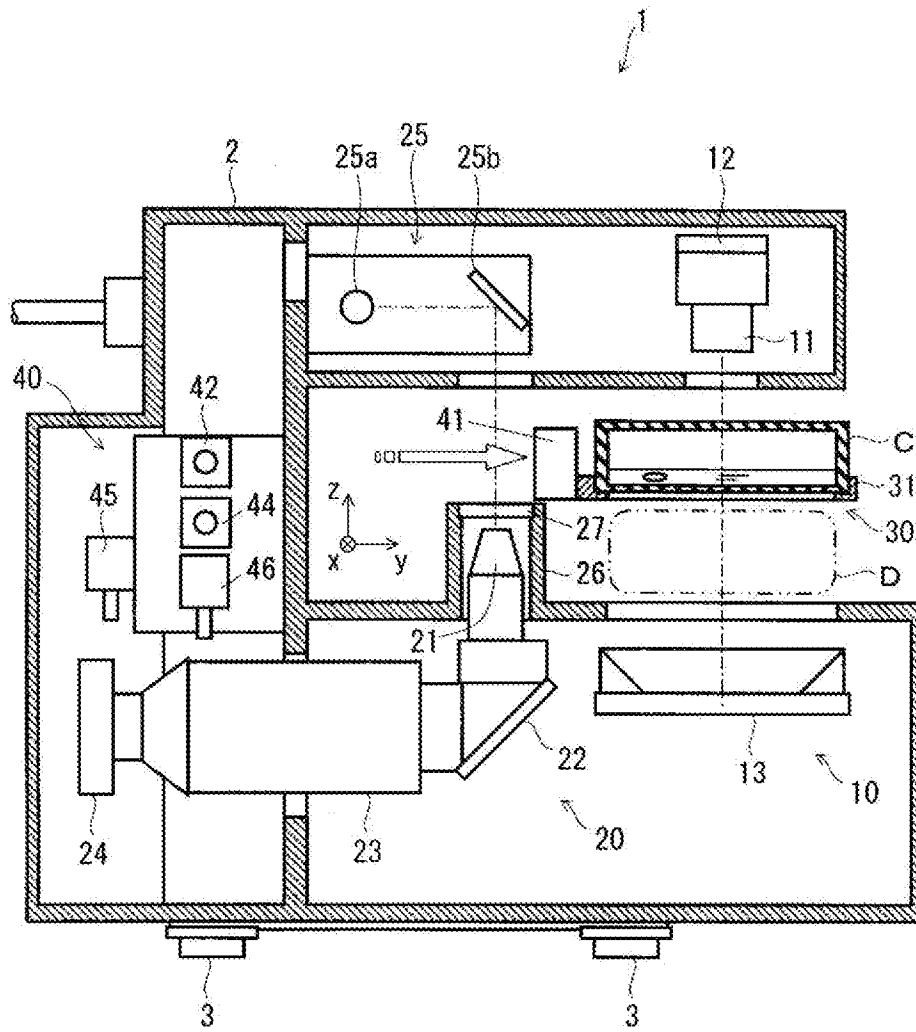
[図2]



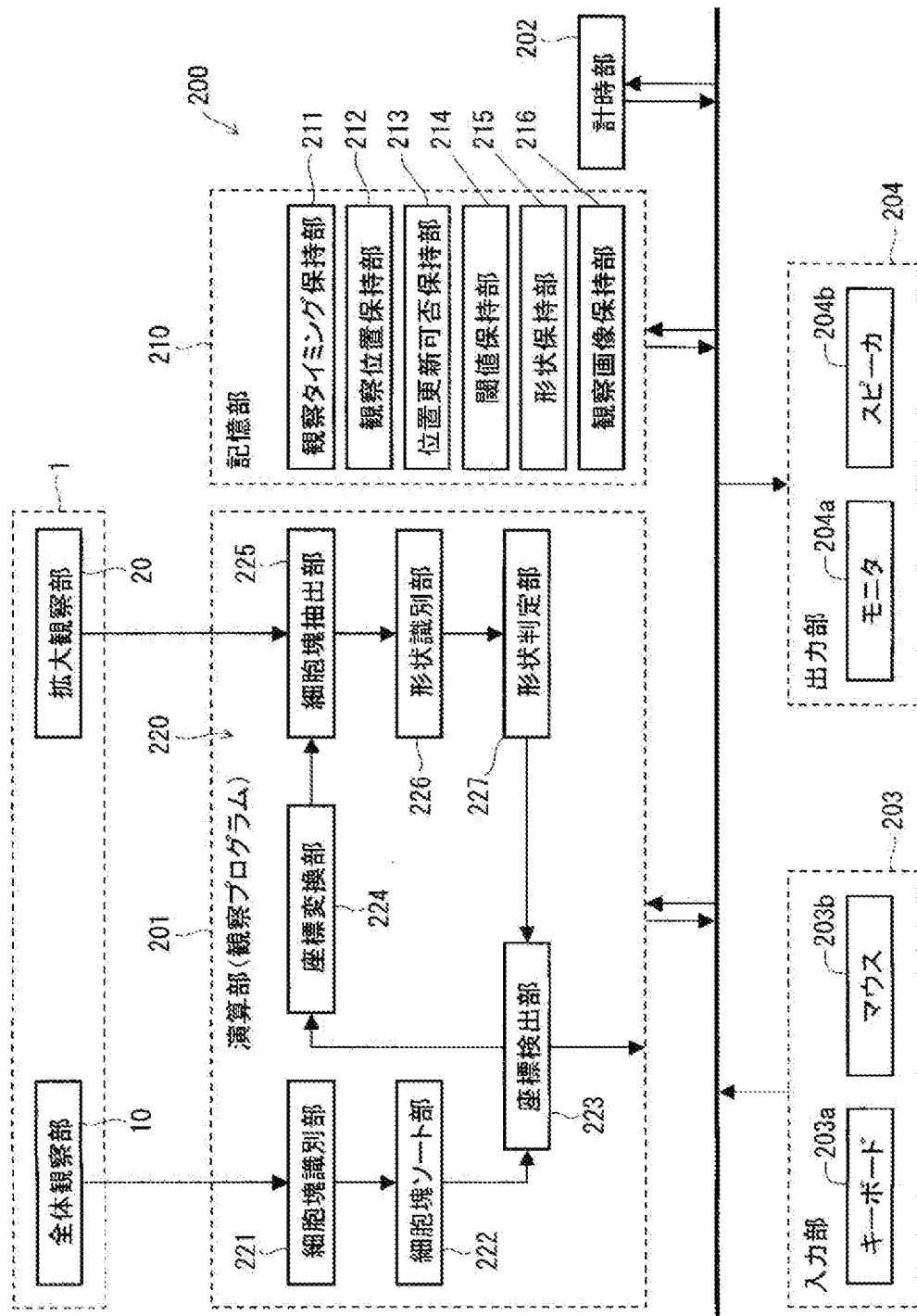
[図3]



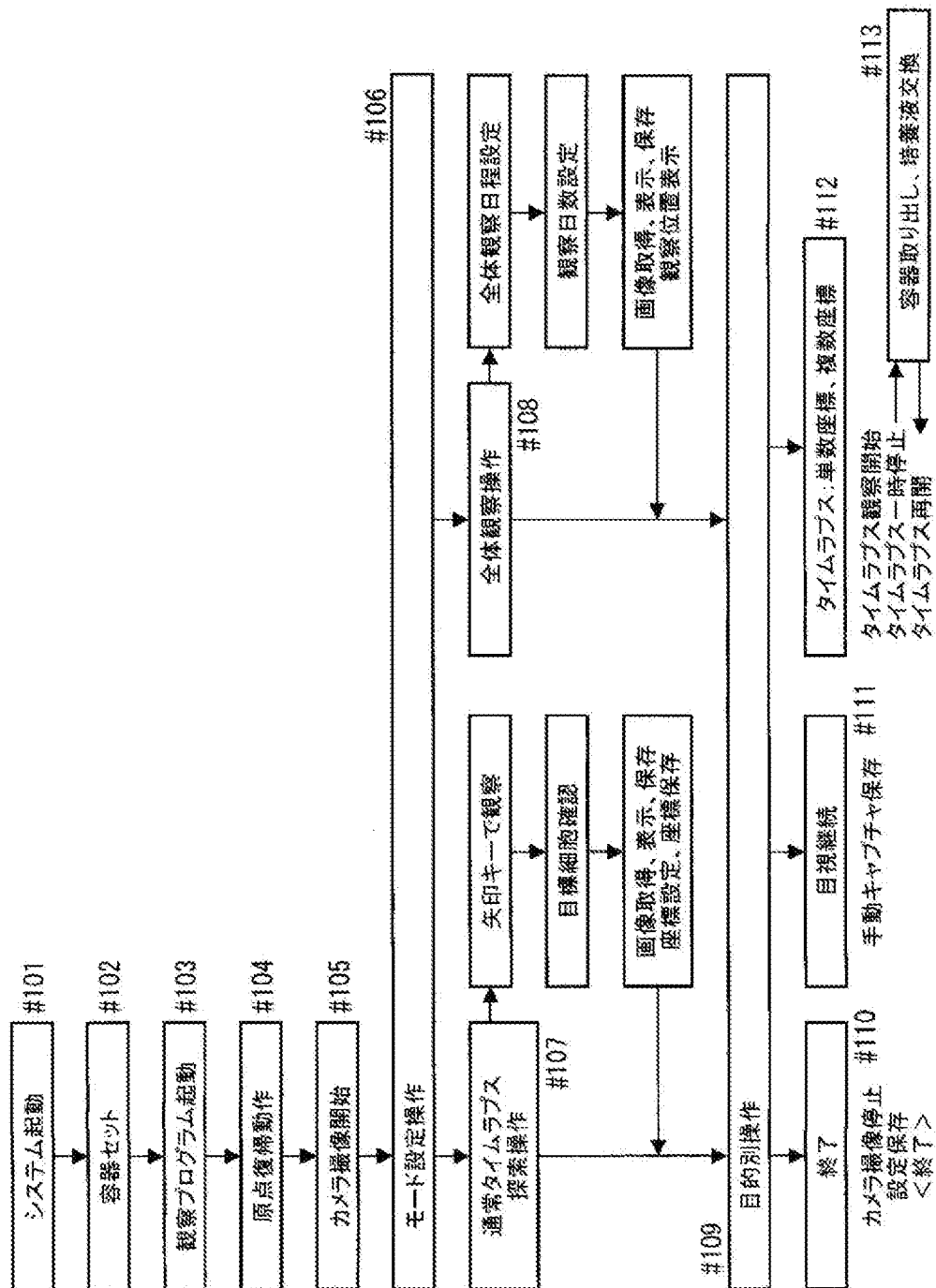
[図4]



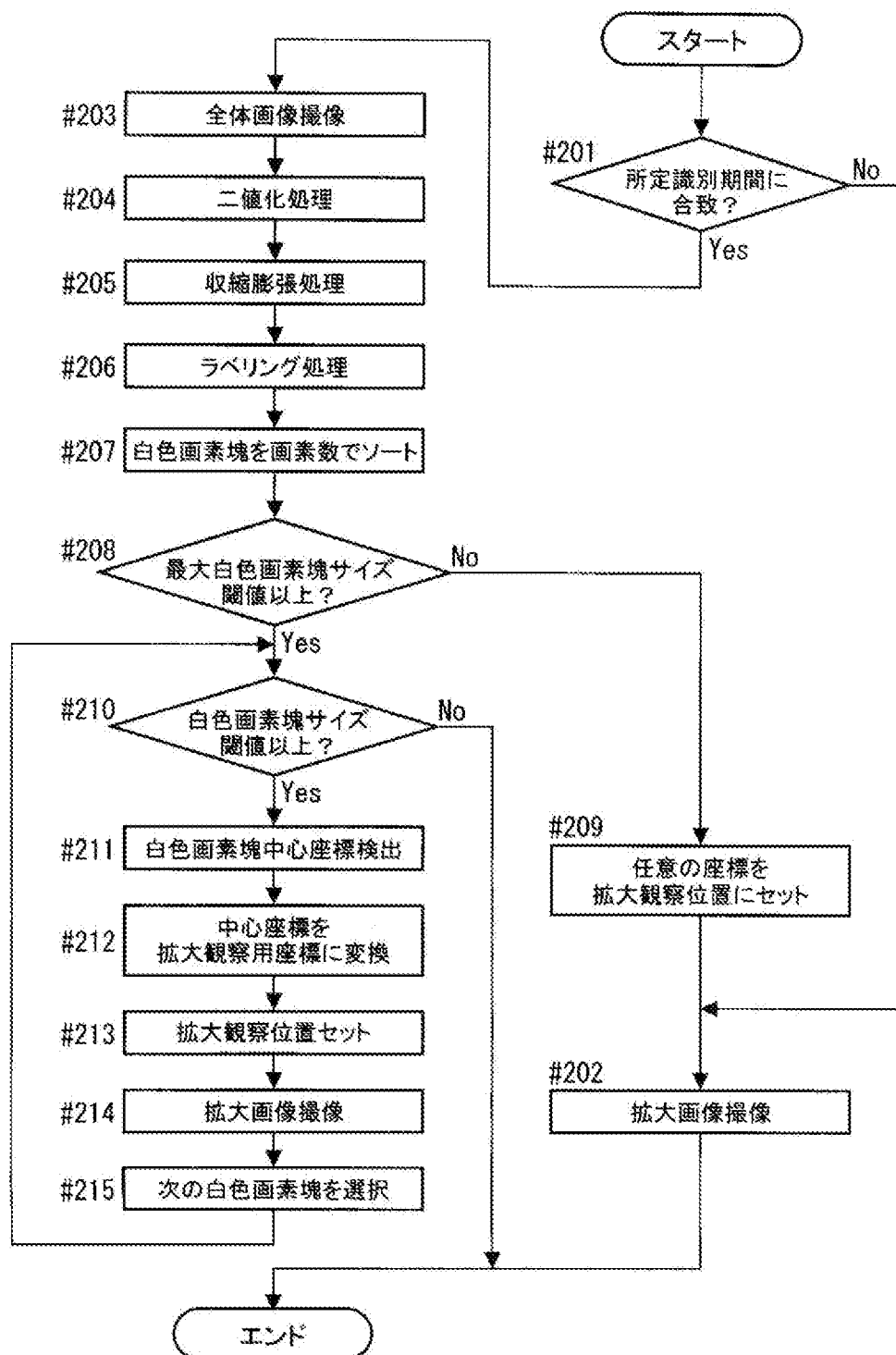
[図5]



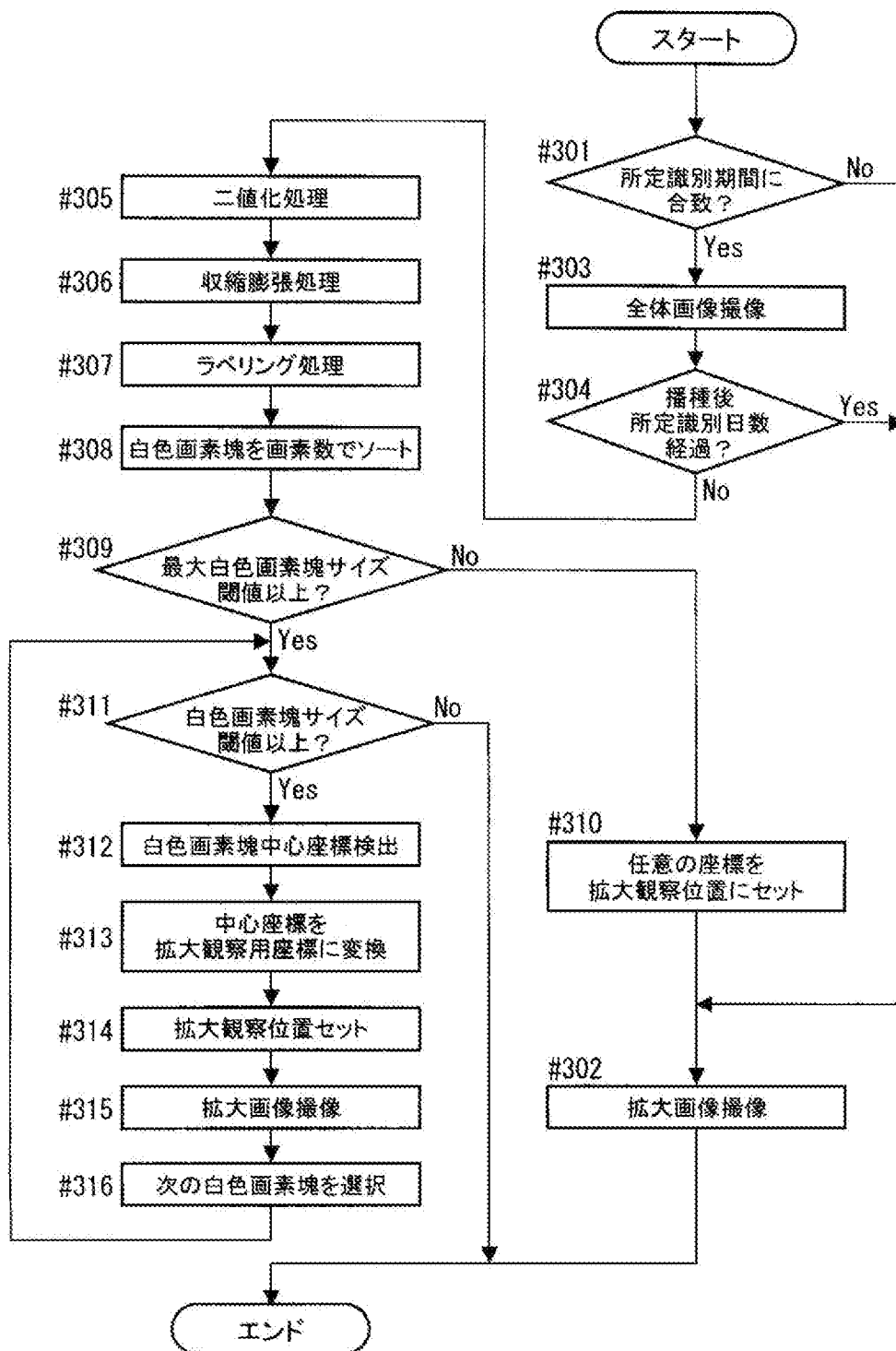
[図6]



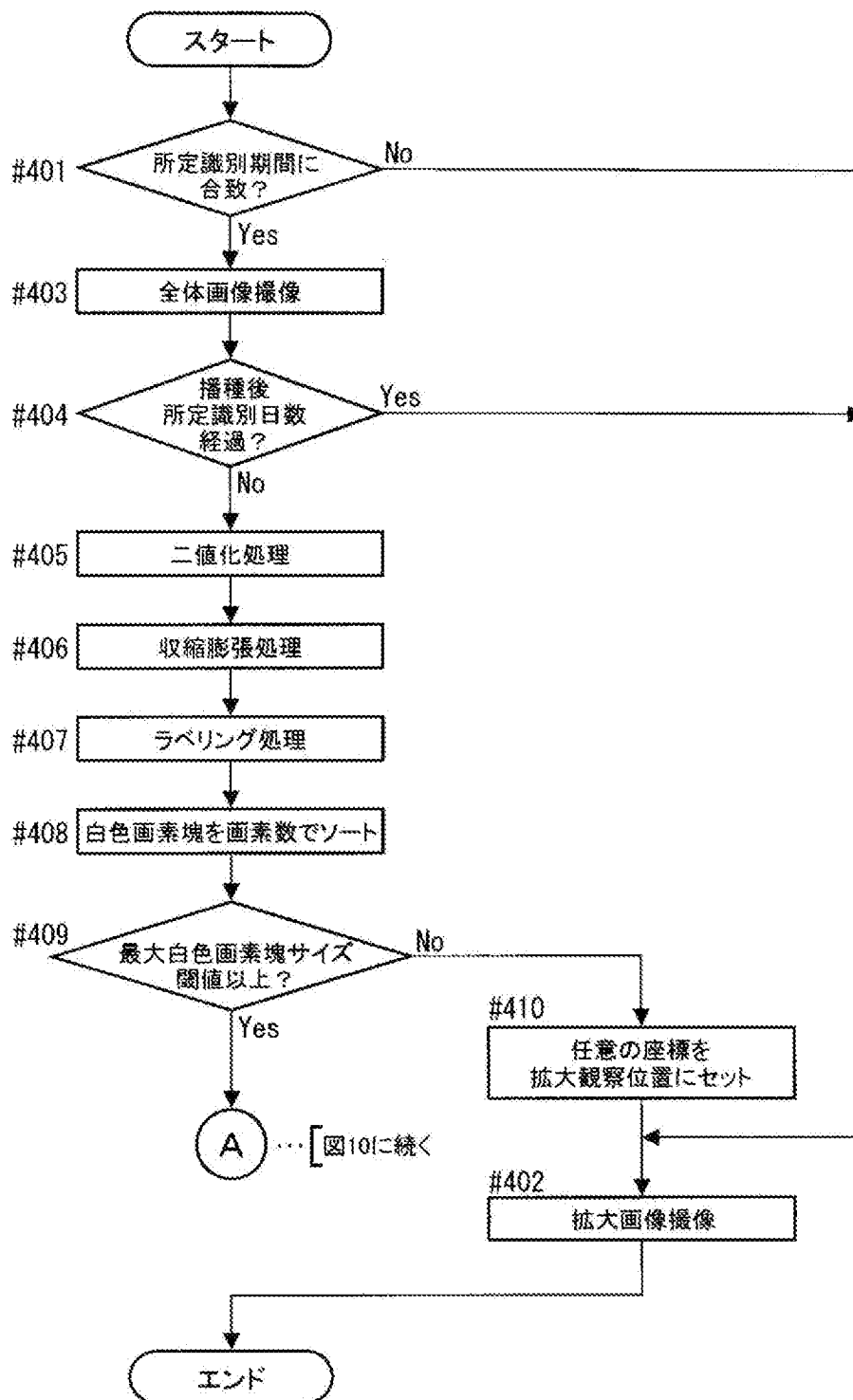
[図7]



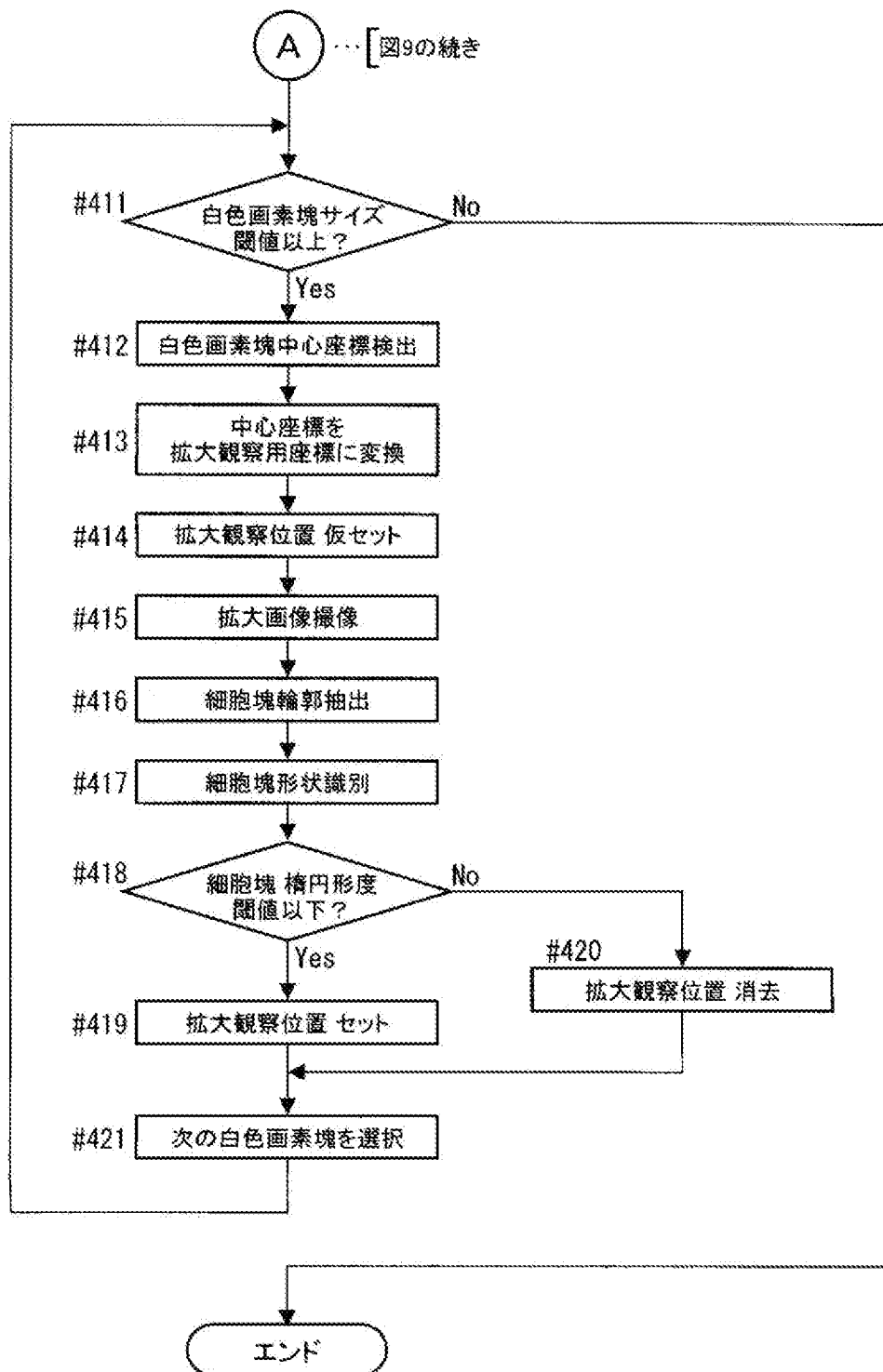
[図8]



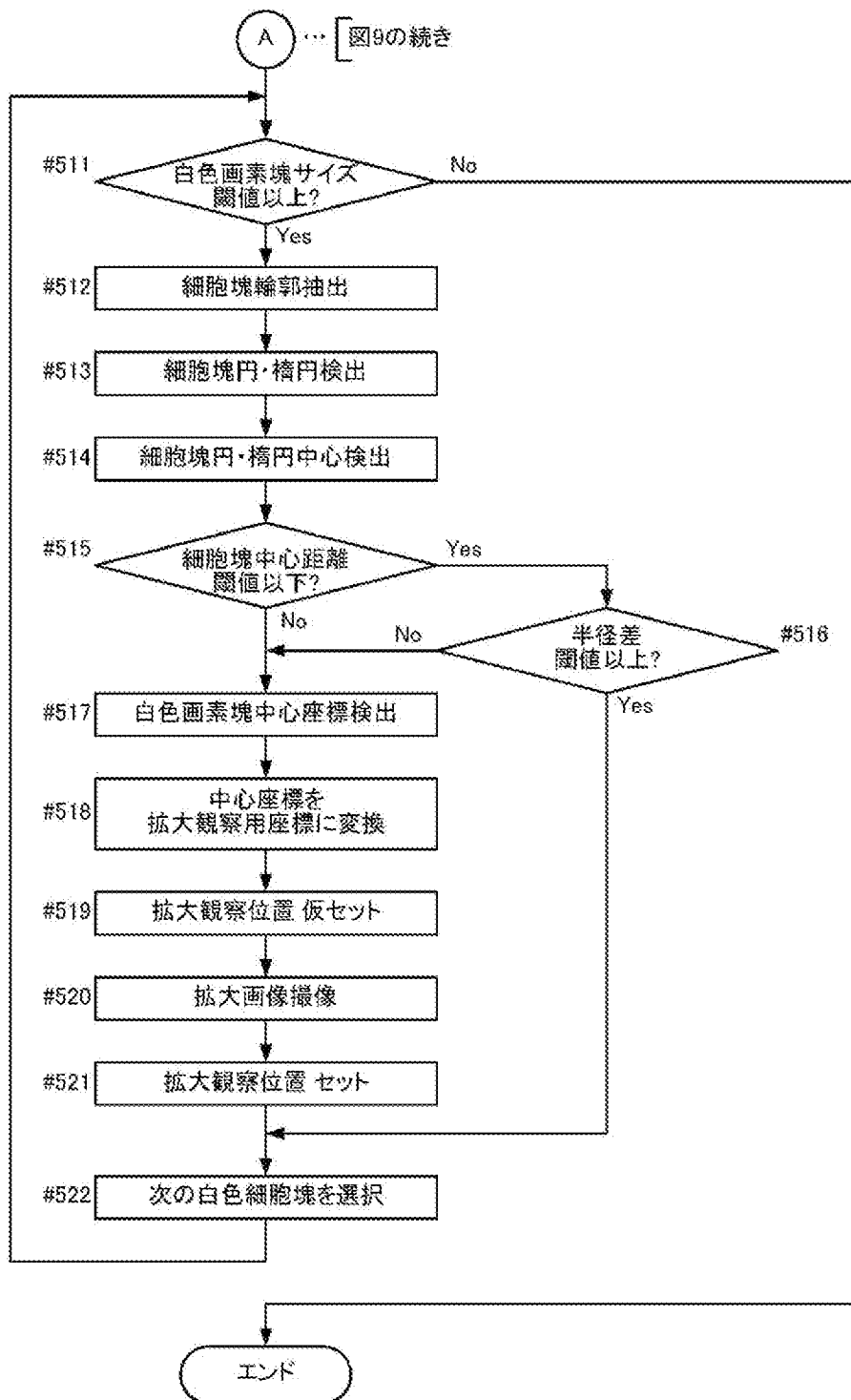
[図9]



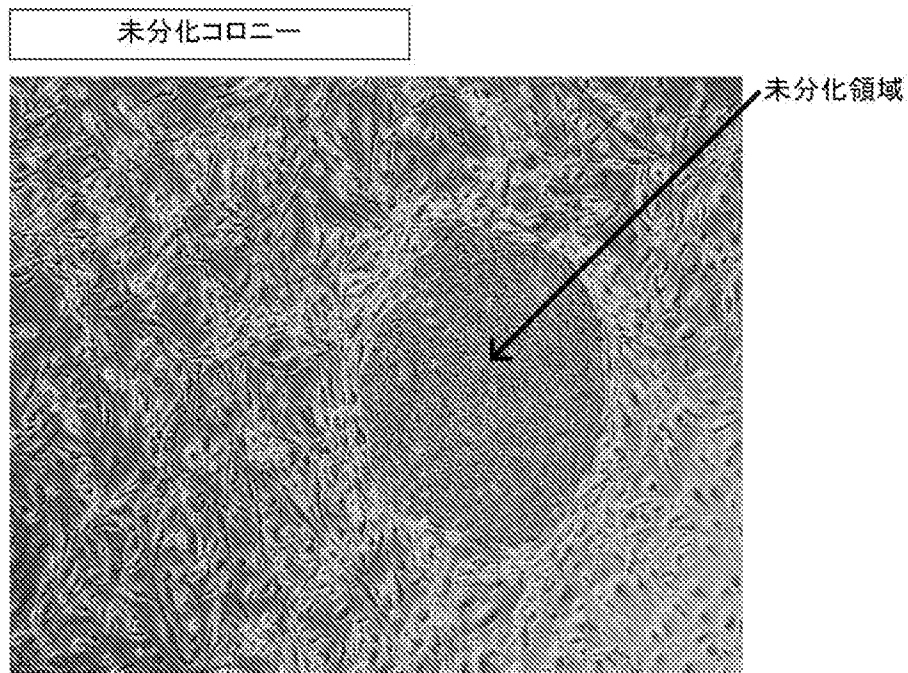
[図10]



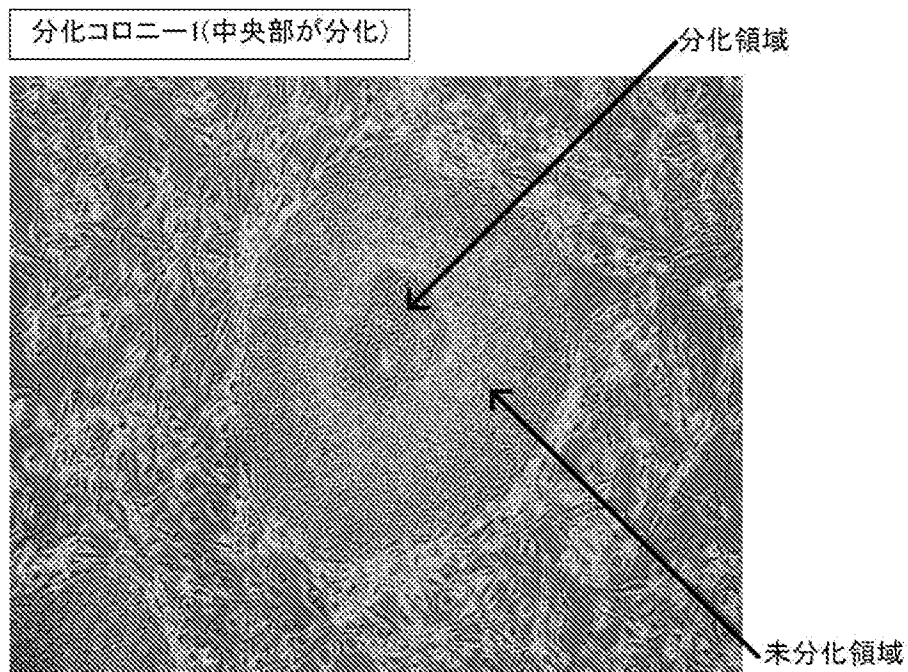
[図11]



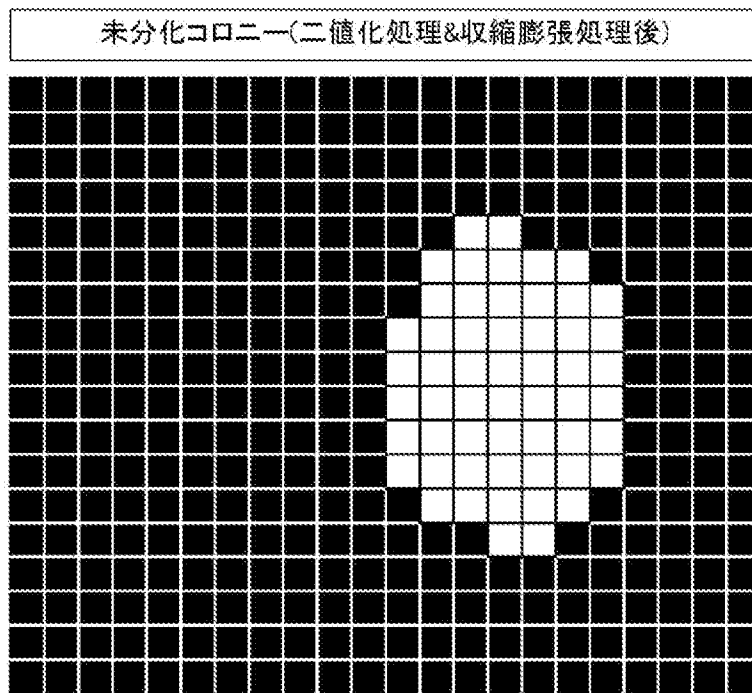
[図12]



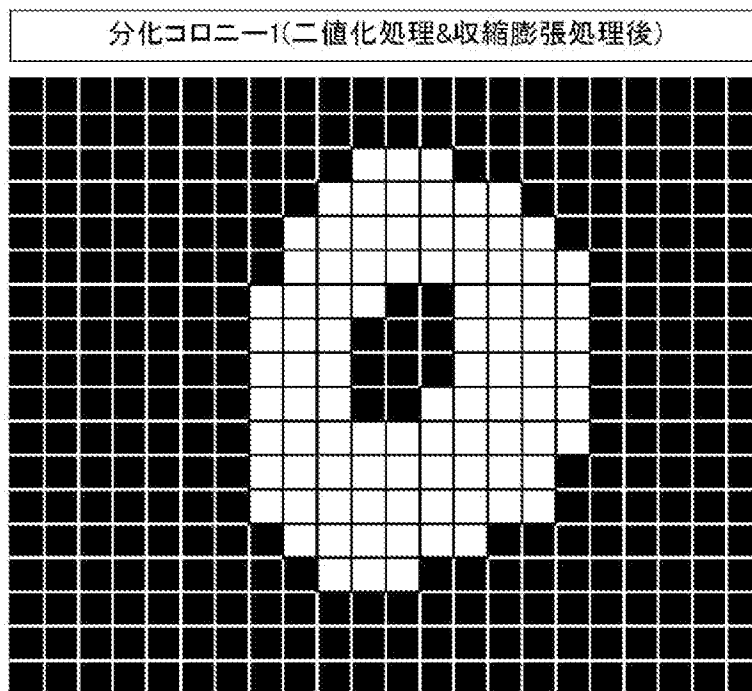
[図13]



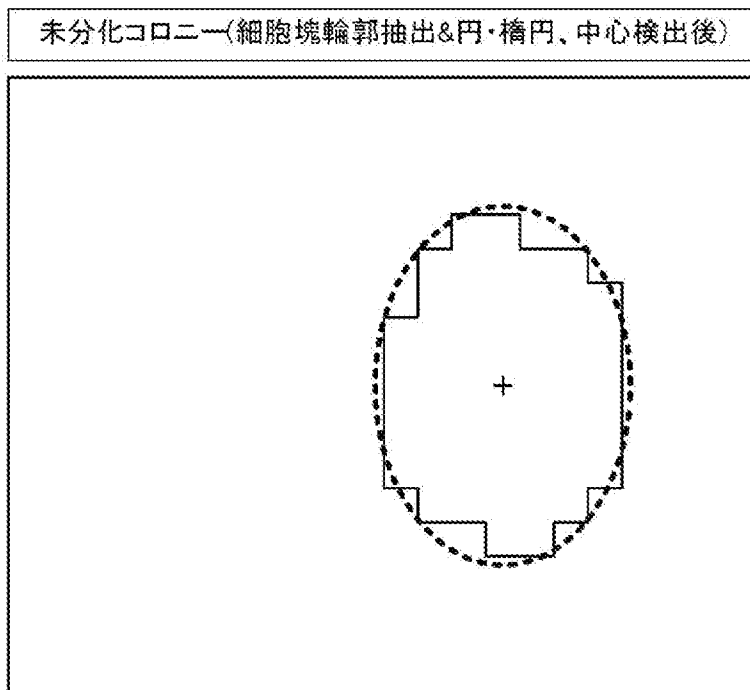
[図14]



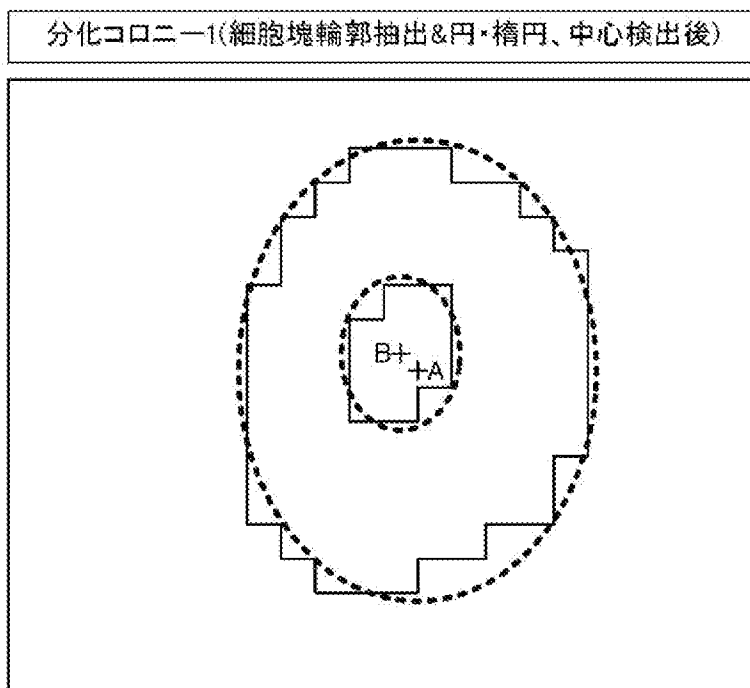
[図15]



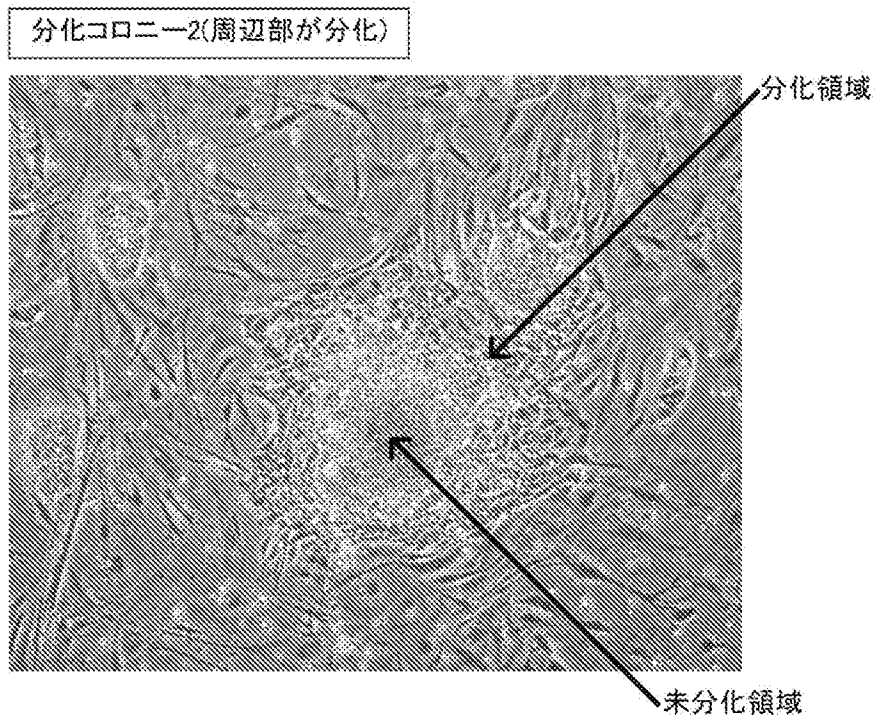
[図16]



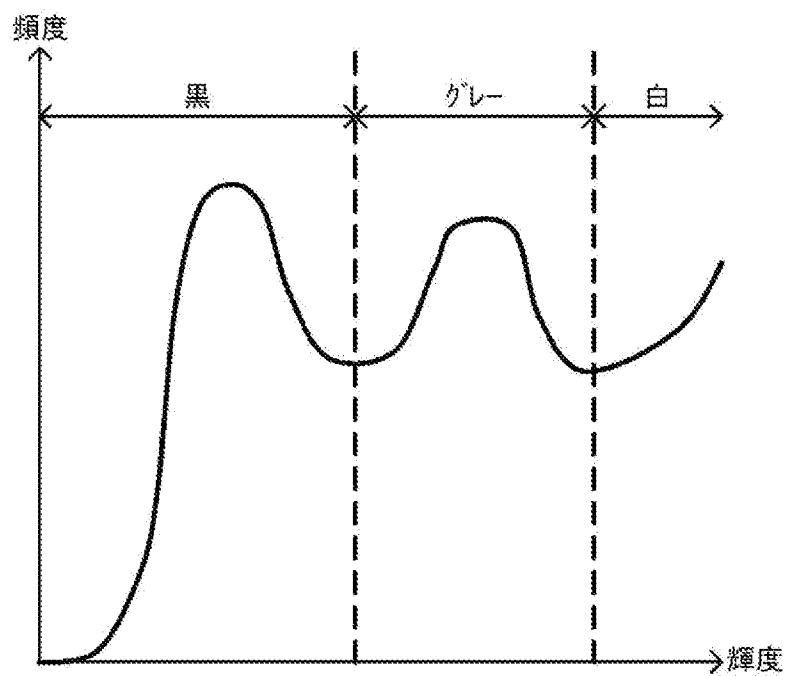
[図17]



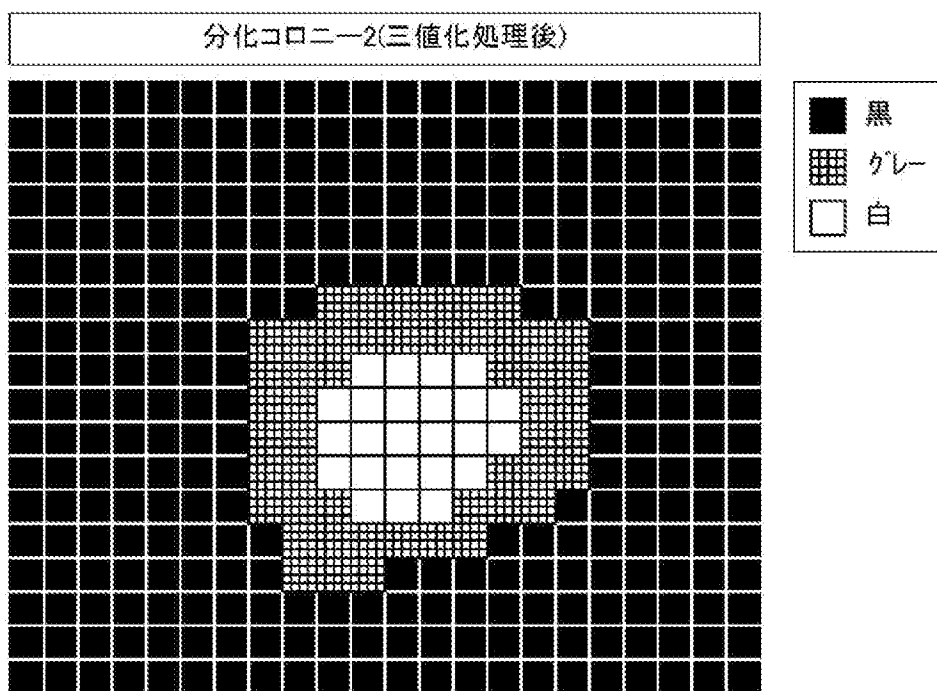
[図18]



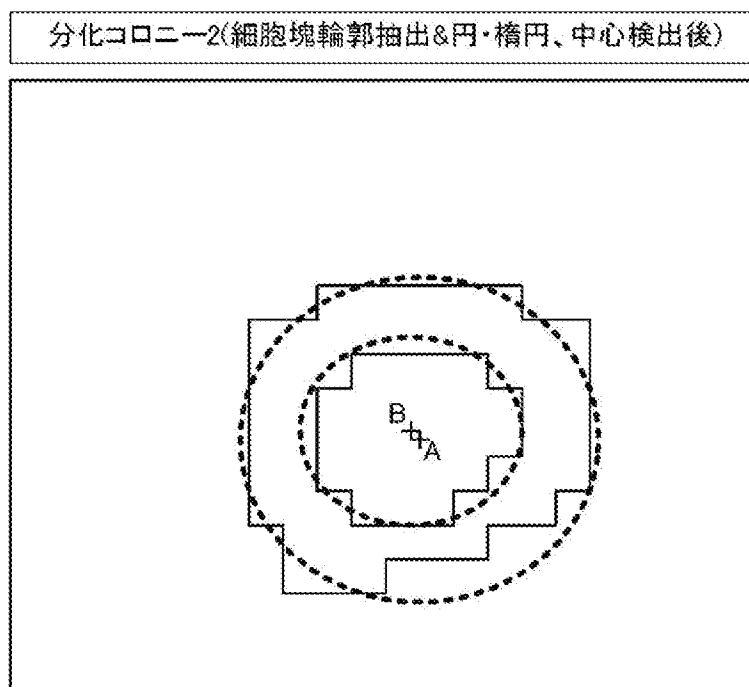
[図19]



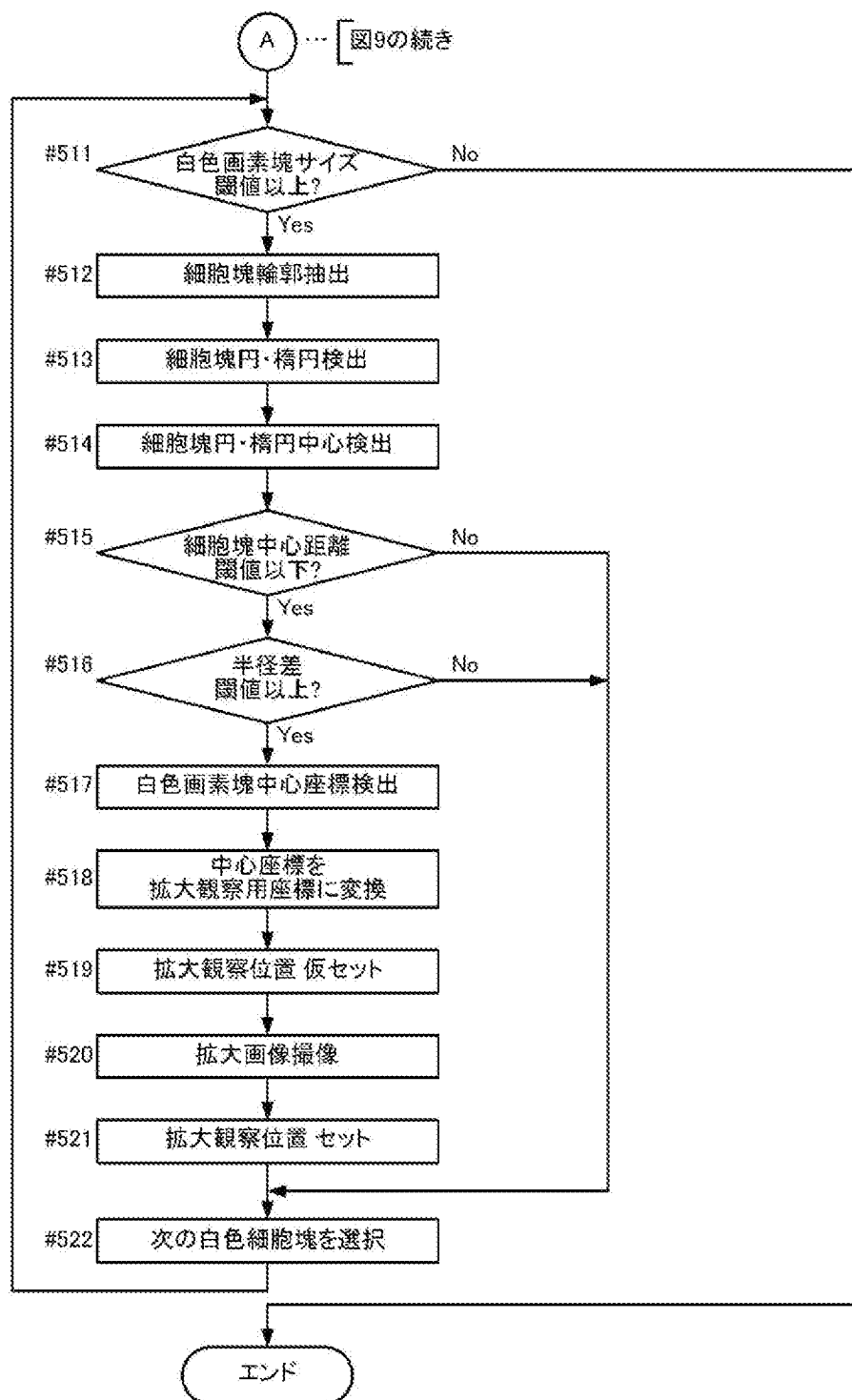
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B21/36(2006.01) i, C12M1/34(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)

G02B21/36, C12M1/34

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2010-527007 A (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), 05 August 2010 (05.08.2010), claims; paragraphs [0003], [0022] & US 2010/0128961 A1 & EP 2143043 A & WO 2008/137912 A1 & CA 2683134 A & AU 2008247379 A	1, 8 2-7, 9
Y A	JP 2008-212017 A (Nikon Corp.), 18 September 2008 (18.09.2008), claims (Family: none)	1, 8 2-7, 9
Y A	JP 2006-91506 A (Nikon Corp.), 06 April 2006 (06.04.2006), claims (Family: none)	1, 8 2-7, 9

☒ 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
27 March, 2012 (27.03.12)

Date of mailing of the international search report
03 April, 2012 (03.04.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079763

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2006-171183 A (Nikon Corp.), 29 June 2006 (29.06.2006), paragraph [0021] (Family: none)	1, 8 2-7, 9
Y A	JP 2006-23644 A (Nikon Corp.), 26 January 2006 (26.01.2006), claims (Family: none)	1, 8 2-7, 9
A	JP 2009-89630 A (Nikon Corp.), 30 April 2009 (30.04.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 2009-195110 A (Nikon Corp.), 03 September 2009 (03.09.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G02B21/36(2006.01)i, C12M1/34(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. G02B21/36, C12M1/34

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 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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)

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 2010-527007 A (ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス・コーポレーション) 2010.08.05, 特許請求の範囲, 【0003】, 【0022】 & US 2010/0128961 A1 & EP 2143043 A & WO 2008/137912 A1 & CA 2683134 A & AU 2008247379 A	1, 8
A		2-7, 9
Y	JP 2008-212017 A (株式会社ニコン) 2008.09.18, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1, 8
A		2-7, 9

☒ 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 7 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 4 . 2 0 1 2

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 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

堀井 康司

2 V

3 7 1 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 7 1

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 A	JP 2006-91506 A (株式会社ニコン) 2006.04.06, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1, 8 2-7, 9
Y A	JP 2006-171183 A (株式会社ニコン) 2006.06.29, 【0021】 (ファ ミリーなし)	1, 8 2-7, 9
Y A	JP 2006-23644 A (株式会社ニコン) 2006.01.26, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1, 8 2-7, 9
A	JP 2009-89630 A (株式会社ニコン) 2009.04.30, 全文全図 (ファミ リーなし)	1-9
A	JP 2009-195110 A (株式会社ニコン) 2009.09.03, 全文全図 (ファ ミリーなし)	1-9