

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7208969号
(P7208969)

(45)発行日 令和5年1月19日(2023.1.19)

(24)登録日 令和5年1月11日(2023.1.11)

(51)国際特許分類	F I	
G 0 2 B 21/06 (2006.01)	G 0 2 B 21/06	
G 0 2 B 5/12 (2006.01)	G 0 2 B 5/12	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	D
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

請求項の数 11 (全20頁)

(21)出願番号	特願2020-502003(P2020-502003)	(73)特許権者	322004393 株式会社エビデント 長野県上伊那郡辰野町大字伊那富666 6番地
(86)(22)出願日	平成30年8月31日(2018.8.31)	(74)代理人	100118913 弁理士 上田 邦生
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/032376	(74)代理人	100142789 弁理士 柳 順一郎
(87)国際公開番号	WO2019/163167	(74)代理人	100201466 弁理士 竹内 邦彦
(87)国際公開日	令和1年8月29日(2019.8.29)	(72)発明者	土肥 将人 東京都八王子市石川町2951番地オ リンバス株式会社内
審査請求日	令和3年3月10日(2021.3.10)	審査官	岡田 弘
(31)優先権主張番号	特願2018-27604(P2018-27604)		
(32)優先日	平成30年2月20日(2018.2.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 観察システム及び観察方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

培養液および前記培養液中に浮遊する細胞を収容する容器と、
照明光を前記容器の外部から該容器の内部へ照射する照明光学系と、
前記容器内の前記細胞からの信号光を集める対物レンズと、
該対物レンズによって集められた前記信号光を検出する検出光学系と、
複数の微小な反射要素が配列されたアレイを有し、前記照明光学系との間に前記容器を挟んで配置され、前記容器を透過した前記照明光を反射する再帰性反射部材とを備え、
前記容器が壁面に曲率または凹凸を有し、
前記照明光が、前記細胞および前記容器壁面を通過し、前記再帰性反射部材で反射され、
再び前記容器壁面および前記細胞を通過する観察システム。

10

【請求項2】

前記照明光学系が、前記対物レンズを経由して前記容器の内部へ前記照明光を照射する請求項1に記載の観察システム。

【請求項3】

前記照明光学系が、前記対物レンズの瞳位置と光学的に共役な位置に配置された開口を有し、

前記検出光学系が、前記対物レンズの瞳位置または該瞳位置と光学的に共役な位置に配置され前記開口の形状に対応する形状を有する位相膜を備える請求項2に記載の観察システム。

20

【請求項 4】

空気とは異なる屈折率を有する媒質を前記対物レンズと前記容器との間に保持する機構を備える請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の観察システム。

【請求項 5】

前記反射要素が、プリズムまたはガラスビーズである、請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の観察システム。

【請求項 6】

前記容器が、バイオリアクタまたはバッグである、請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の観察システム。

【請求項 7】

前記容器の内部には、攪拌羽根が配置されている、請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の観察システム。

10

【請求項 8】

前記信号光が、前記細胞を透過した透過光、前記細胞によって散乱された散乱光、前記細胞から発せられる蛍光のいずれかである、請求項 1 から請求項 7 のいずれかに記載の観察システム。

【請求項 9】

前記細胞が、前記容器内を浮遊する浮遊細胞である、請求項 1 から請求項 8 のいずれかに記載の観察システム。

【請求項 10】

容器内で浮遊する細胞の観察方法であって、
前記容器内で浮遊する細胞に照明光を照射する照射ステップと、
該照射ステップにおいて前記細胞に照射され該細胞を透過した前記照明光を再帰性反射させる反射ステップと、
該反射ステップにおいて再帰性反射された前記照明光が再び前記細胞を透過した透過光、または前記細胞によって散乱された散乱光を撮影する撮影ステップと、を含み、
前記容器が壁面に曲率または凹凸を有し、
前記照明光が、前記細胞および前記容器壁面を通過し、再帰性反射部材で反射され、再び前記容器壁面および前記細胞を通過する観察方法。

20

【請求項 11】

容器内で浮遊する細胞の観察方法であって、
前記容器内で浮遊する細胞に照明光を照射する照射ステップと、
該照射ステップにおいて前記細胞に照射され、該細胞を透過した前記照明光を再帰性反射させる反射ステップと、
前記照射ステップまたは / および前記反射ステップにおいて前記細胞に照射された前記照明光によって前記細胞から発せられる蛍光を撮影する撮影ステップと、を含み、
前記容器が壁面に曲率または凹凸を有し、
前記照明光が、前記細胞および前記容器壁面を通過し、再帰性反射部材で反射され、再び前記容器壁面および前記細胞を通過する観察方法。

30

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、観察装置に関し、特に、浮遊培養用の容器内の細胞を観察する観察装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、iPS細胞を初めとする培養細胞を使用した再生医療分野において、培養のスケールアップが望まれている。培養方法には、接着培養と浮遊培養がある。接着培養は、ウェルプレートまたはディッシュのような小型の容器内で細胞を培養する方法である。浮遊培養は、バイオリアクタのような大型の容器内で培養液中に浮遊させながら細胞を培養す

50

る方法である。細胞を大量生産するために、培養方法は、接着培養から浮遊培養に変わりつつある（例えば、特許文献1参照。）。特許文献1では、容器内の細胞の培養状況を把握するために、容器内の細胞の画像を取得している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開2017-140006号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

形状およびサイズが異なる多種多様な浮遊培養用の容器が存在する。特許文献1に開示されている照明装置を用いた場合、容器の種類に関わらず容器内の細胞を常に同一方向から同一角度で安定して照明することが難しく、画質が安定しないという問題がある。例えば、曲率または凹凸を有する容器の壁は、照明光に対してレンズ効果を発揮する。したがって、容器の壁の曲率または凹凸が変化したときに、容器内に入射する照明光の向きおよび角度が変化する。同一の容器であっても、照明光に対する容器の位置および向きに応じて、容器内に入射する照明光の向きおよび角度が変化し得る。

従来の透過照明光学系による位相差観察等においても、培養容器の形状およびサイズの制限を受け、安定した観察像を得ることが難しい。

【0005】

本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、容器内で培養されている細胞を容器の種類に関わらず安定して照明することができる観察装置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】

【0006】

上記目的を達成するため、本発明は以下の手段を提供する。

本発明の一態様は、培養液および前記培養液中に浮遊する細胞を収容する容器と、照明光を前記容器の外部から該容器の内部へ照射する照明光学系と、前記容器内の前記細胞からの信号光を集める対物レンズと、該対物レンズによって集められた前記信号光を検出する検出光学系と、複数の微小な反射要素が配列されたアレイを有し、前記照明光学系との間に前記容器を挟んで配置され、前記容器を透過した前記照明光を反射する再帰性反射部材とを備え、前記容器が壁面に曲率または凹凸を有し、前記照明光が、前記細胞および前記容器壁面を通過し、前記再帰性反射部材で反射され、再び前記容器壁面および前記細胞を通過する観察システムである。

【0007】

本態様によれば、照明光学系から射出された照明光が容器の内部を透過し、続いて再帰性反射部材によって反射された照明光が容器の内部を再度透過する。すなわち、容器内の細胞には、容器の両側から2回、照明光が照射される。容器内では、照明光の照射によって細胞からの信号光が発生する。容器の外部に射出された信号光は、対物レンズによって集められ、検出光学系によって検出される。これにより、容器の内部の細胞を観察することができる。

【0008】

この場合において、再帰性反射部材の微小な反射要素のアレイは、入射した照明光と同一経路に沿って照明光を反射する。すなわち、照明光は、再帰性反射部材と容器の内部との間に存在する容器の壁を同一経路に沿って相互に逆方向に2回透過するので、再帰性反射部材と容器の内部との間の容器の壁が照明光に与えるレンズ効果はキャンセルされる。したがって、再帰性反射部材から容器内に入射する照明光は、再帰性反射部材と容器の内部との間の容器の壁の影響を受けない。これにより、容器内の細胞を容器の種類に関わらず安定的に照明光で照明することができる。

【0009】

10

20

30

40

50

上記態様においては、前記照明光学系が、前記対物レンズを經由して前記容器の内部へ前記照明光を照射してもよい。

この構成によって、同軸落射照明を用いた細胞からの反射光または散乱光の観察と、透過照明を用いた細胞からの透過光の観察の両方を実現することができる。すなわち、対物レンズを經由した照明光は、対物レンズの光軸に沿って、または略沿って、細胞に照射され、細胞によって反射または散乱された照明光（信号光）が対物レンズによって集められる。これにより、細胞の落射明視野像を観察することができる。一方、再帰性反射部材によって反射された照明光は、対物レンズの光軸に沿って、または略沿って、細胞に照射され、細胞を透過した照明光（信号光）が対物レンズによって集められる。これにより、細胞の透過明視野像を観察することができる。

10

また、再帰性反射部材までの光路において照明光のケラレの発生を低減することができる。

【0010】

上記態様においては、前記照明光学系が、前記対物レンズの瞳位置と光学的に共役な位置に配置された開口を有し、前記検出光学系が、前記対物レンズの瞳位置または該瞳位置と光学的に共役な位置に配置され前記開口の形状に対応する形状を有する位相膜を備えていてもよい。

この構成によって、同軸落射照明を用いた位相差観察を行うことができる。すなわち、照明光学系の開口を通過した照明光は、容器の内部を2回透過し、対物レンズに入射する。容器の内部を透過する間に、照明光の一部は、細胞を通過することによって回折され、照明光の他の部分は、回折されることなく直進する。回折されなかった直進光は、開口と光学的に共役な位置に配置された位相膜を通過することによって位相にずれを生じる。そして、直進光と回折光とが干渉することによって、透明な細胞を明暗によって観察することができる。

20

【0011】

上記態様においては、空気とは異なる屈折率を有する媒質を前記対物レンズと前記容器との間に保持する機構を備えていてもよい。

照明光が透過する位置において容器の壁が曲率または凹凸を有する場合、容器の壁は照明光に対してレンズ効果を発揮する。対物レンズと容器の壁との間に保持された媒質によって容器の壁のレンズ効果を低減し、容器内の細胞をさらに安定的に照明することができる。

30

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、容器内で培養されている細胞を容器の種類に関わらず安定して照明することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の一実施形態に係る観察装置の全体構成図である。

【図2】図1の観察装置に使用される容器の一例である。

【図3】図1の観察装置の再帰性反射部材の構成例である。

40

【図4】図1の観察装置の変形例の部分構成図である。

【図5】図1の観察装置の他の変形例の部分構成図である。

【図6】図1の観察装置の他の変形例の部分構成図である。

【図7】図1の観察装置の他の変形例の部分構成図である。

【図8】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図9】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図10】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図11】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図12】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図13】図1の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

50

【図 1 4】図 1 の観察装置の他の変形例の部分構成図である。

【図 1 5】図 1 の観察装置の他の変形例の全体構成図である。

【図 1 6 A】図 1 の観察装置の他の変形例の部分構成図である。

【図 1 6 B】図 1 6 A の光源を対物レンズの光軸に沿う方向に見た図である。

【図 1 7 A】再帰性反射部材の変形例の構成図である。

【図 1 7 B】図 1 7 A の再帰性反射部材の断面図である。

【図 1 8】再帰性反射部材の他の変形例の断面図である。

【図 1 9 A】再帰性反射部材の配置の変形例を示す図である。

【図 1 9 B】図 1 9 A の再帰性反射部材の配置の具体例を示す図である。

【図 1 9 C】図 1 9 A の再帰性反射部材の配置の他の具体例を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の一実施形態に係る観察装置 1 について、図面を参照して以下に説明する。

本実施形態に係る観察装置 1 は、図 1 に示されるように、浮遊培養用の容器 2 内で培養されている細胞を容器 2 の外側から観察するためのものである。図 1 は、上方から鉛直方向に見た観察装置 1 を示している。

【0015】

容器 2 は、図 2 に示されるように、照明光に対して光学的に透明な材質からなる任意の種類 of 容器である。容器 2 内には、培養液 A および培養液 A 中に浮遊する細胞 B が収容される。容器 2 の材質、形状およびサイズは特に制限されない。具体的には、容器 2 の材質は、硬質および柔軟のいずれであってもよい。容器 2 の形状は、箱状、筒状、または袋状等の任意の形状であってもよい。容器 2 のサイズは、大型および小型のいずれであってもよい。参照する図面には、容器 2 の一例として、柔軟な材質からなる円筒状のバッグが示されている。容器 2 の内部には、攪拌器のシャフト 3 a および攪拌羽根 3 b が配置されている。シャフト 3 a の回転によって培養液 A 中の攪拌羽根 3 b が回転し、回転する攪拌羽根 3 b によって培養液 A が攪拌され、細胞 B が培養液 A 中に浮遊し続ける。

20

【0016】

観察装置 1 は、容器 2 の側方に配置された対物レンズ 4 と、光源 5 からの照明光を対物レンズ 4 を経由して容器 2 の外側から容器 2 の内部へ照射する照明光学系 6 と、容器 2 を透過した照明光を容器 2 へ向かって反射する再帰性反射部材 7 と、対物レンズ 4 によって集められた照明光を検出する検出光学系 8 とを備えている。

30

【0017】

光源 5 は、位相差画像の取得に一般に使用される光源、例えば、水銀、ハロゲン、キセノンまたは LED 等のランプ光源である。

対物レンズ 4 の光軸は略水平方向に配置され、対物レンズ 4 は容器 2 の方を向いている。対物レンズ 4 の焦点面 F は、容器 2 の内部に配置される。

【0018】

照明光学系 6 は、円環状の開口（リングスリット）6 1 a を有する絞り 6 1 と、リレー光学系 6 2 と、ハーフミラー 6 3 とを備えている。符号 6 4 は、光源 5 から射出された照明光を平行光に変換するレンズである。

40

絞り 6 1 のリングスリット 6 1 a は、対物レンズ 4 の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されている。レンズ 6 4 からの照明光は、絞り 6 1 においてリングスリット 6 1 a のみを通過する。

【0019】

リレー光学系 6 2 は、リングスリット 6 1 a からの照明光をリレーする。このようなリレー光学系 6 2 は、例えば、一對の凸レンズから構成される。

ハーフミラー 6 3 は、リレー光学系 6 2 からの照明光の一部（例えば、20%）を対物レンズ 4 に向かって反射する。また、ハーフミラー 6 3 は、対物レンズ 4 からの照明光の一部（例えば、80%）を透過させる。

【0020】

50

ハーフミラー 63 によって反射された照明光は、対物レンズ 4 の光軸に沿って対物レンズ 4 に入射し、対物レンズ 4 から容器 2 へ向かって射出される。すなわち、対物レンズ 4 は、照明光学系 6 の一部としても機能する。対物レンズ 4 からの照明光は、容器 2 の側壁を透過し、容器 2 の内部を略水平方向に横断し、容器 2 の側壁を再び透過し、容器 2 の外部へ射出される。絞り 61 の位置は、絞り 61 に入射する照明光の光軸に直交する方向に調整可能である。絞り 61 の位置調整によって、対物レンズ 4 から容器 2 に入射する照明光の位置を照明光の光軸に交差する方向に変更することができる。

【0021】

再帰性反射部材 7 は、対物レンズ 4 との間に容器 2 を略水平方向に挟んで配置されている。再帰性反射部材 7 は、面 P に沿って多数の微小な反射要素 7a が配列されたアレイを有している。面 P は、容器 2 を透過した照明光の光軸に交差する面である。反射要素 7a は、例えば、プリズムまたは球状のガラスビーズである。

10

【0022】

図 3 は、再帰性反射部材 7 の構成の一例を示している。図 3 に示されるように、多数の反射要素 7a は、ベース部材 7b の表面との間に反射膜 7c を隔てて配置され、ベース部材 7b の表面に沿って配列されている。図中、符号 7d は、剥離フィルムであり、符号 7e は、剥離フィルム 7d とベース部材 7b とを接着させる接着剤である。

【0023】

反射要素 7a に入射した照明光は、反射膜 7c によって反射され、入射時とは逆向きに反射要素 7a から射出される。反射要素 7a は微小であるので、入射時と射出時との間で照明光の経路のシフトはほとんど生じない。したがって、再帰性反射部材 7 によって反射された照明光は、再帰性反射部材 7 に入射する照明光の経路と同一の経路に沿って戻る。すなわち、容器 2 の内部と再帰性反射部材 7 との間で照明光は同一経路を往復する。

20

【0024】

反射要素 7a が配列される面 P は、平面および曲面のいずれであってもよい。例えば、面 P は、図 1 に示されるように、一定の曲率を有し一方方向に湾曲する曲面であってもよく、図 4 に示されるように、複数方向に湾曲する曲面であってもよい。

対物レンズ 4 および再帰性反射部材 7 は、対物レンズ 4 と再帰性反射部材 7 との間で照明光の光路に攪拌器のシャフト 3a および攪拌羽根 3b が干渉しない位置に配置される。

【0025】

検出光学系 8 は、対物レンズ 4 の瞳位置に配置された位相膜 81 と、撮像素子 82 と、結像レンズ 83 とを備えている。

30

位相膜 81 は、リングスリット 61a の形状に対応する形状（すなわち円環状）を有する。位相膜 81 は、位相膜 81 を透過する照明光の位相をシフトさせる。位相膜 81 は、図 5 に示されるように、対物レンズ 4 の瞳位置と光学的に共役な位置に配置されていてもよい。符号 84 は、対物レンズ 4 の瞳を位相膜 81 にリレーするリレー光学系である。

【0026】

結像レンズ 83 は、対物レンズ 4 によって集められハーフミラー 63 を透過した照明光を撮像素子 82 上に結像させる。

撮像素子 82 は、2次元イメージセンサ（例えば、CCD イメージセンサまたは CMOS イメージセンサ）である。撮像素子 82 は、結像レンズ 83 によって結ばれた像を撮像し、細胞 B の位相差画像を取得する。

40

【0027】

次に、観察装置 1 の作用について説明する。

光源 5 からの照明光は、図 1 に示されるように、照明光学系 6 から対物レンズ 4 を経由して容器 2 に照射される。照明光は、容器 2 内に入射し、容器 2 内の培養液 A を透過し、容器 2 から射出される。続いて、照明光は、再帰性反射部材 7 によって反射され、再び容器 2 内に入射し、容器 2 内の培養液 A を逆向きに透過し、容器 2 から射出される。したがって、容器 2 内で培養液 A 中に浮遊する細胞 B は、対物レンズ 4 による落射照明と再帰性反射部材 7 による透過照明の 2 種類の照明法によって照明される。

50

【 0 0 2 8 】

容器 2 内を 2 回透過する間に、照明光の一部（信号光）は、培養液 A 中に浮遊する透明な細胞 B を透過し、屈折する。容器 2 を 2 回透過した後、照明光は、対物レンズ 4 に入射し、対物レンズ 4 およびハーフミラー 6 3 を透過し、結像レンズ 8 3 によって撮像素子 8 2 上に結像される。

【 0 0 2 9 】

ここで、対物レンズ 4 内には、リングスリット 6 1 a と光学的に共役な位置に位相膜 8 1 が配置されている。容器 2 内で細胞 B を透過した照明光（屈折光）は、対物レンズ 4 内で位相膜 8 1 とは異なる位置を通過し、対物レンズ 4 から射出される。一方、容器 2 内で細胞 B を透過しなかった照明光（直進光）は、対物レンズ 4 内で位相膜 8 1 を透過することによって位相にシフトが与えられ、対物レンズ 4 から射出される。したがって、撮像素子 8 2 上には、屈折光と直進光との干渉による明暗がついた細胞 B の光学像が形成され、撮像素子 8 2 によって細胞 B の位相差画像が取得される。

10

【 0 0 3 0 】

この場合において、再帰性反射部材 7 は、上述したように、多数の微小な反射要素 7 a によって、入射時と同一経路に沿って照明光を反射する。したがって、再帰性反射部材 7 から容器 2 内に入射した照明光は、再帰性反射部材 7 と容器 2 の内部との間に存在する容器 2 の側壁の形状に関わらず、容器 2 内の細胞 B を同一方向から同一角度で照明する。

【 0 0 3 1 】

例えば、容器 2 の側壁が曲率または凹凸を有する場合、容器 2 の側壁は照明光に対してレンズ効果を発揮する。ただし、容器 2 の側壁を照明光が同一経路に沿って往復することによって、レンズ効果はキャンセルされる。すなわち、再帰性反射部材 7 から容器 2 内に入射する照明光の向きおよび角度は、再帰性反射部材 7 と容器 2 の内部との間の側壁の影響を受けない。したがって、容器 2 が柔軟な材質からなり容器 2 の側壁が継時的に変形したとしても、あるいは、容器 2 を形状およびサイズが異なる他の容器 2 に交換したとしても、再帰性反射部材 7 からの照明光によって容器 2 内の細胞 B を安定的に照明することができる。

20

【 0 0 3 2 】

対物レンズ 4 と容器 2 の内部との間の容器 2 の側壁が平坦である場合、対物レンズ 4 から容器 2 内に入射した照明光は、対物レンズ 4 の光軸に沿って進む。すなわち、同軸落射照明が実現される。

30

一方、対物レンズ 4 と容器 2 の内部との間の容器 2 の側壁が曲率または凹凸を有する場合、対物レンズ 4 から容器 2 内に入射する照明光の光軸が、容器 2 の側壁のレンズ効果によって対物レンズ 4 の光軸に対して傾く。その結果、再帰性反射部材 7 から対物レンズ 4 に戻った照明光（直進光）の位置が、位相膜 8 1 の位置から光軸に交差する方向にずれることがある。このような場合には、再帰性反射部材 7 から対物レンズ 4 に戻った照明光（直進光）が位相膜 8 1 を透過するように、絞り 6 1 の位置調整によって、照明光学系 6 から容器 2 に照射される照明光の位置が調整される。

【 0 0 3 3 】

本実施形態においては、図 6 および図 7 に示されるように、対物レンズ 4 と容器 2 との間に、空気とは異なる屈折率を有する媒質 M が充填されてもよい。媒質 M は、例えば、水、オイル、ゲルまたは吸水性ポリマである。媒質 M の屈折率は、培養液 A の屈折率と同一または近いことが好ましい。媒質 M の屈折率は、容器 2 の材質の屈折率と同一または近くてもよい。

40

対物レンズ 4 と容器 2 との間の媒質 M によって、対物レンズ 4 から容器 2 内に入射する照明光に対する、容器 2 の側壁のレンズ効果が低減される。これにより、容器 2 の側壁が曲率または凹凸を有する場合に、対物レンズ 4 から細胞 B に照射される照明光の向きおよび角度を安定させることができる。

【 0 0 3 4 】

媒質 M は、図 6 に示されるように、媒質 M の表面張力によって対物レンズ 4 と容器 2 と

50

の間に保持されてもよい。あるいは、図 7 に示されるように、媒質 M を対物レンズ 4 と容器 2 との間に保持する機構 9 が設けられていてもよい。

【 0 0 3 5 】

機構 9 は、例えば、対物レンズ 4 の先端面と容器 2 の側壁との間の空間を密閉する筒状の壁 9 a と、流動性の媒質 M を収容する容器 9 b と、壁 9 a の内部と容器 9 b の内部とを接続する管 9 c とを備えている。容器 9 b から壁 9 a の内部へ管 9 c を経由して媒質 M が供給される。壁 9 a は、長手方向（対物レンズ 4 の光軸に沿う方向）に伸縮可能であることが好ましい。例えば、壁 9 a は、蛇腹構造を有していてもよい。壁 9 a の伸縮によって、壁 9 a の内部の密閉性を維持しながら対物レンズ 4 を光軸方向に移動させることができる。

10

【 0 0 3 6 】

本実施形態においては、照明光学系 6 が、対物レンズ 4 を経由して照明光を容器 2 に照射することとしたが、これに代えて、図 4 に示されるように、対物レンズ 4 を経由せずに照明光を容器 2 に照射してもよい。図 4 の照明光学系 6 は、対物レンズ 4 の側方に配置され、照明光を射出する光源 6 5 を備えている。照明光の光軸を対物レンズ 4 の光軸にできるだけ近付かせるために、光源 6 5 は対物レンズ 4 の近傍に配置されることが好ましい。

【 0 0 3 7 】

本実施形態においては、照明光学系 6 から容器 2 に略水平方向に照明光が照射されることとしたが、照明光学系 6 から容器 2 への照明光の照射方向は、水平方向以外の方向であってもよい。

20

例えば、図 8 に示されるように、照明光学系 6 から容器 2 へ上方向に照明光が照射されてもよい。図 8 の変形例において、対物レンズ 4 は容器 2 の下方に配置され、再帰性反射部材 7 は、容器 2 の上方に配置される。

【 0 0 3 8 】

培養液 A の液面は、表面張力によって凹面となり、照明光に対してレンズ効果を発揮する。図 8 の変形例によれば、再帰性反射部材 7 を用いることによって、培養液 A の液面が照明光に与えるレンズ効果をキャンセルすることができる。

【 0 0 3 9 】

本実施形態においては、リングスリット 6 1 a および位相膜 8 1 を用いて細胞 B の位相差画像を観察することとしたが、これに代えて、細胞 B の明視野画像を観察してもよい。すなわち、図 4 または図 5 に示されるように、照明光学系 6 が絞り 6 1 を備えず、検出光学系 8 が位相膜 8 1 を備えていなくてもよい。図 4 および図 5 の変形例において、細胞 B の落射明視野画像と透過明視野画像が観察される。

30

【 0 0 4 0 】

本実施形態と同様の構成を落射型の微分干渉観察に適用してもよい。

この場合には、図 9 に示されるように、照明光学系 6 が、光源 5 からの照明光を通過させるポライザ（偏光子）9 1 を備え、観察装置 1 が、対物レンズ 4 の瞳位置近傍に複屈折素子 9 2 を備え、検出光学系 8 がアナライザ（直交ニコル、検光子）9 3 を備えていてもよい。複屈折素子 9 2 は、例えば D I C プリズムであり、ポライザ 9 1 を透過した照明光を透過させ、かつ対物レンズ 4 によって集光された細胞 B からの信号光を透過させる。アナライザ 9 3 は、複屈折素子 9 2 を透過した細胞 B からの信号光を透過させる。

40

【 0 0 4 1 】

光源 5 からの照明光は、ポライザ 9 1 を透過することによって偏光方向を一方向に設定され、複屈折素子 9 2 を透過することによって偏光方向の異なる 2 つの照明光に分けられる。その後、2 つの照明光は細胞 B を透過する。光路の異なる 2 つの照明光には、厚さの変化を有する細胞 B を透過する際に光路差が与えられる。2 つの照明光は、再帰性反射部材 7 によって反射された後に、再度細胞 B の同一位置を透過することによって光路差が再度与えられる。

【 0 0 4 2 】

そして、2 つの照明光は、複屈折素子 9 2 を再度通過することによって同じ光路に合成

50

され、アナライザ 9 3 を通過する。これにより、光路差を有する 2 つの照明光の干渉によって明暗のコントラストが発生し、細胞 B を微分干渉像により観察することができる。

この場合においても、細胞 B の各位置を透過した照明光を再帰性反射部材 7 によって再度同一位置に通過させることにより、複屈折により発生する位相差を 2 倍にすることができる。

【 0 0 4 3 】

本実施形態と同様の構成を偏斜照明による透過観察に適用してもよい。

この場合には、図 1 0 に示されるように、照明光学系 6 が、対物レンズ 4 の瞳位置に光学的に共役な位置に、光軸中心から径方向に離れた位置に配置されたリングスリット（開口）1 0 1 を備え、細胞 B に対して特定の角度で照明光を入射させることとしてもよい。

10

対物レンズ 4 の光軸に対して斜め方向に細胞 B を透過した照明光が再帰性反射部材 7 によって反射されることにより、対物レンズ 4 とは反対側から対物レンズ 4 の光軸に対して斜め方向に細胞 B に照明光が照射される偏斜照明が生成される。そして、細胞 B を透過した照明光がハーフミラー 6 3 によって分岐され C C D 等の撮像素子 8 2 によって撮影されることにより、立体感のある細胞 B の像を観察することができる。

【 0 0 4 4 】

図 1 0 の観察装置と同様の構成を暗視野観察に適用してもよい。

この場合には、図 1 1 に示されるように、検出光学系 8 が、対物レンズ 4 の瞳位置と光学的に共役な位置近傍において、リングスリット（開口）1 0 1 に対応する位置に配置される減光部材 1 0 2 を備えていてもよい。減光部材 1 0 2 は、例えば、照明光の一部をカットする絞り、または、ND フィルタである。

20

この構成によれば、偏斜照明として再帰性反射部材 7 から細胞 B を通過した直接光の光量を減光部材 1 0 2 によって抑えることができ、これによって暗視野観察を行うことができる。

【 0 0 4 5 】

図 1 1 には、暗視野観察への適用例を示したが、減光部材 1 0 2 に代えて位相膜を備えることによって、位相差観察専用の対物レンズを用いなくても位相差観察を行うことができるという利点がある。

【 0 0 4 6 】

本実施形態において、図 1 2 に示されるように、蛍光観察が可能な構成であってもよい。

30

この場合には、照明光学系 6 が、励起フィルタ 1 2 1 を備え、検出光学系 8 が、ダイクロイックミラー 1 2 2 および励起カットフィルタ 1 2 3 を備える。光源 5 から射出された照明光は、リレー光学系 1 2 4 によってリレーされ、励起フィルタ 1 2 1 を透過することによって励起光に生成され、励起光が細胞 B に照射される。励起光の照射によって、細胞 B 内に含有されている蛍光物質が励起され、細胞 B から蛍光（信号光）が発生する。蛍光は、ダイクロイックミラー 1 2 2 によって照明光学系 6 の光路から分岐され、励起光カットフィルタ 1 2 3 によって励起光が除去された後に撮像素子 8 2 によって撮影される。これによって、蛍光観察を行うことができる。

【 0 0 4 7 】

図 1 2 の観察装置と同様の構成を落射型のレーザ走査共焦点蛍光観察に適用してもよい。

40

この場合には、図 1 3 に示されるように、照明光学系 6 が、レーザ光源 1 3 1 およびスキャナ 1 3 2 を備え、検出光学系 8 が、共焦点ピンホール 1 3 4 および光検出器 1 3 5 を備える。光検出器 1 3 5 は、例えば、PMT（光電子増倍管）である。

レーザ光源 1 3 1 からのレーザ光（励起光）は、照明光学系 6 および対物レンズ 4 によって容器 2 内に入射し、対物レンズ 4 の焦点面 F 上に集光され、光スポットを形成する。光スポットは、スキャナ 1 3 2 によって 2 次元的に走査される。

【 0 0 4 8 】

光スポットの走査範囲内に細胞 B が存在する場合、光スポットの各走査位置において、細胞 B 内に含有されている蛍光物質が励起されて蛍光が発生し、発生した蛍光が各走査位置から全方向に射出される。各走査位置から発生した蛍光の一部は、容器 2 を透過し、対

50

物レンズ 4 によって集光され、スキャナ 1 3 2 を経由してレーザ光の光路を戻す途中でダイクロイックミラー 1 2 2 によってレーザ光の光路から分岐される。その後、蛍光は、結像レンズ 8 3、共焦点ピンホール 1 3 4 および励起光カットフィルタ 1 2 3 を通過し、光検出器 1 3 5 によって検出される。

【 0 0 4 9 】

細胞 B が透明であるため、細胞 B に入射したレーザ光の一部は、細胞 B を透過し、容器 2 から対物レンズ 4 とは反対側へ射出される。射出されたレーザ光は、再帰性反射部材 7 によって反射されて、同じ経路を辿って、再度、細胞 B に対物レンズ 4 とは反対側から入射する。

【 0 0 5 0 】

この場合において、再帰性反射部材 7 は、多数の微小の反射要素 7 a によって、経路のシフトをほとんど発生させることなく同じ経路を戻すようにレーザ光を反射する。これにより、容器 2 による曲率等の状態に関わらず、レーザ光の光スポットを最初の走査位置とほぼ同一位置に再度形成することができる。

【 0 0 5 1 】

すなわち、同じ走査位置にレーザ光を往復 2 回にわたって照射するので、各走査位置において発生させる蛍光をほぼ 2 倍に増大させることができる。これにより、明るい蛍光画像を取得することができるという利点がある。

【 0 0 5 2 】

容器 2 内のレーザ光が通過する領域の全てにおいて蛍光が発生するが、対物レンズ 4 の焦点位置に形成される光スポット以外の領域において発生した蛍光は、共焦点ピンホール 1 3 4 を通過できないため、光検出器 1 3 5 によって検出されることはない。

【 0 0 5 3 】

図 1 3 には、共焦点蛍光観察の一例として、スキャナ 1 3 2 と共焦点ピンホール 1 3 4 とを備えるレーザ走査型を示したが、これに代えて、図 1 4 に示されるように、共焦点ディスク 1 4 1 を備える方式を採用してもよい。

共焦点ディスク 1 4 1 は、対物レンズ 4 の焦点位置と光学的に共役な位置に配置され、励起光および蛍光を透過させる複数のピンホール 1 4 1 a を備える。検出光学系 8 は、複数のピンホール 1 4 1 a を通過した蛍光を同時に検出可能な CCD イメージセンサ等の撮像素子 1 4 2 を備える。

【 0 0 5 4 】

光源 5 からの照明光から、励起フィルタ 1 2 1 によって励起光が生成される。生成された励起光は、共焦点ディスク 1 4 1 を通過し、集光レンズ 1 4 3 によって集光される。これにより、容器 2 内に配置される対物レンズ 4 の焦点位置に、多数の光スポットが形成される。共焦点ディスク 1 4 1 を回転等させることによって、多数の光スポットを容器 2 内において走査することができる。

【 0 0 5 5 】

各走査位置において発生した蛍光は、共焦点ディスク 1 4 1 のピンホール 1 4 1 a を通過した後、ダイクロイックミラー 1 2 2 によって励起光の光路から分岐され、励起光カットフィルタ 1 2 3 によって励起光が除去された後に撮像素子 1 4 2 によって撮影される。

この場合においても、再帰性反射部材 7 によって、各光スポットの位置に励起光が 2 回照射される。また、各光スポットの位置において発生した蛍光も再帰性反射部材 7 により反射されることによって、当該光スポットから発生した蛍光の一部として検出される。したがって、明るい蛍光画像を取得することができるという利点がある。

【 0 0 5 6 】

蛍光観察においては、図 1 5 に示されるように、光源 5 として、多光子蛍光観察用に、極短パルスレーザ光を射出する光源 1 5 1 を用いてもよい。

図 1 5 の観察装置は、検出光学系 8 のダイクロイックミラー 1 2 2 を対物レンズ 4 の直近に配置し、共焦点用のピンホール 1 3 4、1 4 1 をなくしている点で、前述した蛍光観察装置と相違している。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

光源 1 5 1 からの極短パルスレーザー光は、スキャナ 1 3 2 によって走査され、対物レンズ 4 の焦点位置に集光され、光スポットを形成する。焦点位置の光スポットでは、光子密度が増大する。したがって、多光子励起効果により、光スポットの位置において限定的に蛍光が発生する。発生した蛍光の内、対物レンズ 4 側に射出された蛍光は、対物レンズ 4 によって集光され、ダイクロイックミラー 1 2 2 によって極短パルスレーザー光の光路から分岐され、励起光カットフィルタ 1 2 3 によってレーザー光成分が除去され、光検出器 1 3 5 によって検出される。これにより、蛍光画像を取得することができる。

【 0 0 5 8 】

レーザー走査型の共焦点蛍光観察と同様にして、極短パルスレーザー光は再帰性反射部材 7 によって反射されるが、再度入射した容器 2 内の光スポットの位置において波面を分割して反射されることにより、パルス幅が増大するので多光子励起効果は発生しない。したがって、レーザー走査型の共焦点蛍光観察とは異なり、励起光の 2 回照射による蛍光量の増加効果は得られない。ただし、蛍光を光スポットの位置において限定的に発生させるため、反射要素 7 a による微小なシフトが発生してもフレアを発生させることがない。したがって、再帰性反射部材 7 側に射出された蛍光を再帰性反射部材 7 によって容器 2 の同じ位置に戻し、対物レンズ 4 によって集光することができる。このように、通常の落射型の観察では捨てられている蛍光を回収することで、明るい蛍光画像を取得することができるという利点がある。

【 0 0 5 9 】

図 1 5 と同様の構成により、多光子励起効果により発生した蛍光に代えて、極短パルスレーザー光が入射されることにより細胞 B において誘起される第 2 次高調波 (S H G) および第 3 次高調波 (T H G) を検出する観察装置を採用してもよい。

この場合、光源 1 5 1 として、例えば、波長 1 2 0 0 n m の極短パルスレーザー光を射出する光源が採用される。励起光カットフィルタ 1 2 3 として、波長 1 2 0 0 n m の極短パルスレーザー光を遮断し、波長 6 0 0 n m および波長 4 0 0 n m の極短パルスレーザー光を透過させるフィルタが採用される。

【 0 0 6 0 】

細胞 B 内の特定の物質によって非線形効果によって発生する高調波 (信号光) を検出することにより、蛍光標識することなく透明な細胞を検出することができる。また、通常、高調波は、極短パルスレーザー光の入射方向とは反対側に透過する方向に多く発生する。本例によれば、細胞 B から対物レンズ 4 とは反対側に発生した高調波が再帰性反射部材 7 によって細胞 B 側に戻される。これにより、コンパクトな落射型の構成によって高調波を効率的に検出することができるという利点がある。

【 0 0 6 1 】

上記の蛍光観察において、再帰性反射部材 7 に近接して配置され蛍光を遮断する光学フィルタを備えていてもよい。

光学フィルタは、レーザー光の照射によって細胞 B において発生した蛍光のうち、再帰性反射部材 7 側に射出された蛍光を遮断する。したがって、光学フィルタは、例えば、容器 2 と再帰性反射部材 7 との間に配置される。

【 0 0 6 2 】

散乱の強い細胞 B の場合には、細胞 B において発生した蛍光が再帰性反射部材 7 側に射出される。再帰性反射部材 7 で反射された蛍光は、細胞 B で再度散乱されることによってコントラストを低下させることがある。再帰性反射部材 7 と細胞 B との間に光学フィルタを配置することによって、再帰性反射部材 7 側に射出される蛍光が光学フィルタで遮断され、励起光のみが光学フィルタを透過する。そして、励起光のみが再帰性反射部材 7 によって反射され、細胞 B に再度入射する。これにより、コントラストの低下を防ぎつつ、蛍光強度を 2 倍にできる。

【 0 0 6 3 】

具体的には、細胞 B の各位置を透過した励起光は再帰性反射部材 7 によって反射されて

10

20

30

40

50

細胞 B の同じ位置に再度入射するので、細胞 B の各位置において約 2 倍の蛍光を発生させることができる。

【 0 0 6 4 】

これにより、明るい蛍光画像を取得することができる。

この場合において、光源が点光源ではない場合（例えば、水銀光源）には、軸上の励起光のみならず、軸外の励起光も細胞 B に照射される。本実施形態に係る観察装置によれば、軸上の励起光のみならず軸外の励起光についても、再帰性反射部材 7 によって同一経路を戻るように反射されるので、上記効果を得ることができる。

【 0 0 6 5 】

上記実施形態および変形例において、図 1 6 A に示されるように、光源 5 を対物レンズ 4 の周囲に配置してもよい。特に、図 1 6 B に示されるように、光源 5 をリング状に配置してもよい。

10

このような配置によれば、細胞 B によって散乱された散乱光を観察することが可能となり、偏斜照明様の観察を行うことができる。また、蛍光観察の場合には、検出光学系 8 の光軸外から細胞 B に励起光が照射されるので、対物レンズ 4 によって集光される励起光が少なくなり、良好な蛍光画像を取得することができる。

【 0 0 6 6 】

図 1 7 A から図 1 8 は、再帰性反射部材 7 の構造の変形例を示している。上記実施形態および変形例において、図 1 7 A から図 1 8 に示される、凹凸形状を有する再帰性反射部材 7 を採用してもよい。

20

再帰性反射部材 7 は、図 1 7 A および図 1 7 B に示されるように、幾何学的な形状を有する反射部材であり、反射された照明光が再帰性反射部材 7 に入射する照明光の経路と同一の経路に沿って戻るように構成されていてもよい。図 1 7 A および図 1 7 B の例の場合、3 枚の反射面から 1 つの反射要素 7 a が構成される。

あるいは、再帰性反射部材 7 は、図 1 8 に示されるように、波面状の反射部材であり、反射された照明光が再帰性反射部材 7 に入射する照明光の経路と同一の経路に沿って戻るように構成されていてもよい。

【 0 0 6 7 】

上記実施形態および変形例においては、再帰性反射部材 7 が容器 2 外に配置されることとしたが、図 1 9 A に示されるように、再帰性反射部材 7 が容器 2 と一体に設けられていてもよい。

30

再帰性反射部材 7 は、その効果を発揮することができる限りにおいて、容器 2 の任意の位置に設けることができる。例えば、図 1 9 B に示されるように、再帰性反射部材 7 は、容器 2 の壁 2 a の外面に沿って設けられていてもよい。あるいは、図 1 9 C に示されるように、容器 2 の壁 2 a の内部に設けられていてもよい。

【 0 0 6 8 】

上記実施形態および変形例において使用される容器 2 の材質は、光学的に透明であることが好ましい。また、容器 2 の材質の屈折率 N_d は、 $1.3 \sim 2$ であることが好ましい。例えば、容器 2 の材質は、フッ素樹脂またはガラスであることが好ましい。

【 0 0 6 9 】

これまで観察装置について説明してきたが、本発明は、再帰性反射部材を用いて、容器内で浮遊する細胞を観察する観察方法も含む。

40

容器内で浮遊する細胞を観察する観察方法の一例は、

(A) 容器内の細胞に照明光を照射する照射ステップと、

(B) 照射ステップにおいて前記細胞に照射され該細胞を透過した光を再帰性反射させる反射ステップと、

(C) 反射ステップにおいて再帰性反射され、前記細胞を透過した、または前記細胞によって散乱された光を撮影する撮影ステップと、を含む。

【 0 0 7 0 】

容器内で浮遊する細胞を観察する観察方法の他の例は、

50

(a) 容器内の細胞に照明光を照射する照射ステップと、
 (b) 照射ステップにおいて前記細胞に照射され該細胞を透過した光を再帰性反射させる反射ステップと、

(c) 照射ステップおよび/または再帰性反射ステップにおいて前記細胞に照射された照明光によって細胞から発せられる蛍光を撮影する撮影ステップと、を含む。

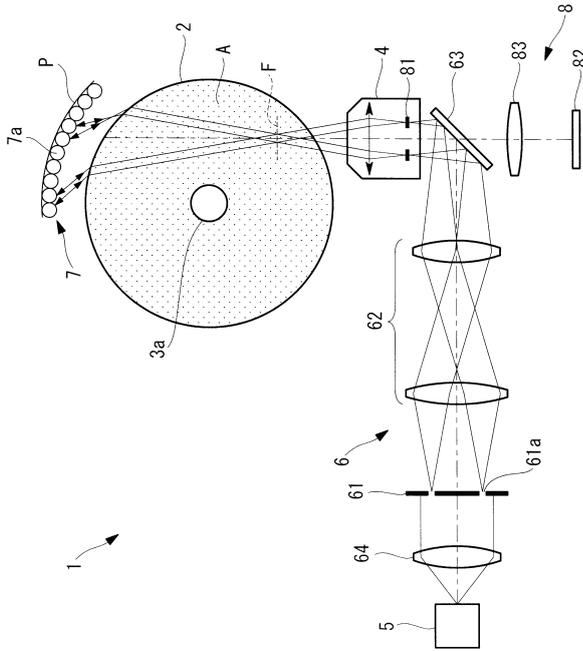
ステップ(C)または(c)に記載された再帰性反射は、照明光の入射角と射出角とが等しい、または略等しいことを意味し、上述した微小な反射要素によって実現される。

【符号の説明】

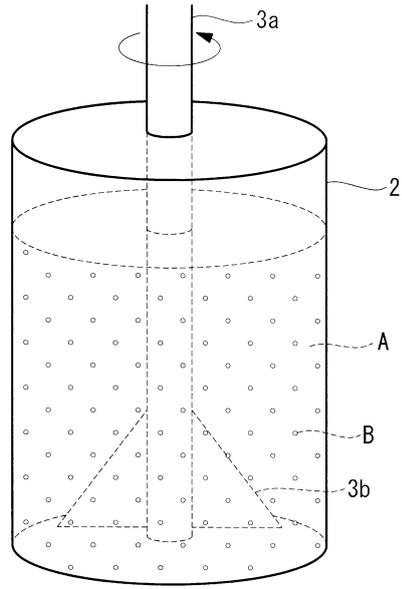
【 0 0 7 1 】

1	観察装置	10
2	容器	
3 a	シャフト	
3 b	攪拌羽根	
4	対物レンズ	
5	光源	
6	照明光学系	
6 1	絞り	
6 1 a	リングスリット、開口	
6 2	リレー光学系	
6 3	ハーフミラー	20
7	再帰性反射部材	
7 a	反射要素	
8	検出光学系	
8 1	位相膜	
8 2	撮像素子	
8 3	結像レンズ	
9	機構	
A	培養液	
B	細胞	
M	媒質	30

【図面】
【図 1】



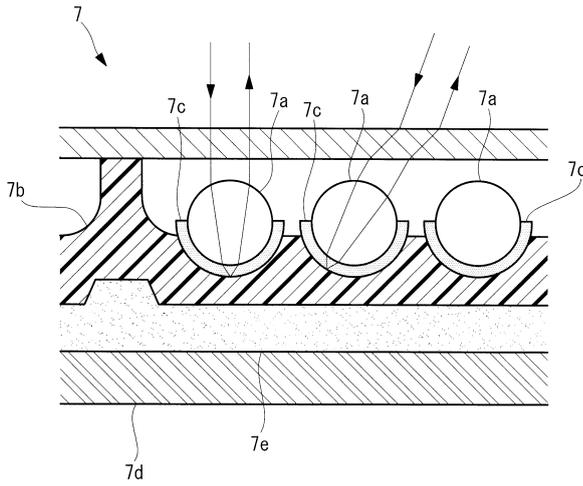
【図 2】



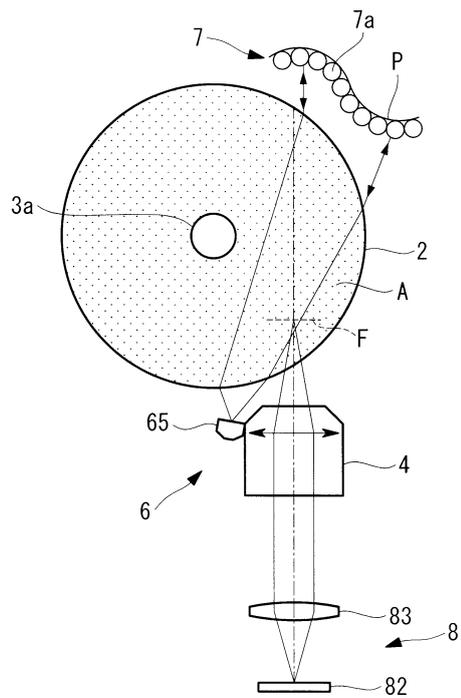
10

20

【図 3】



【図 4】

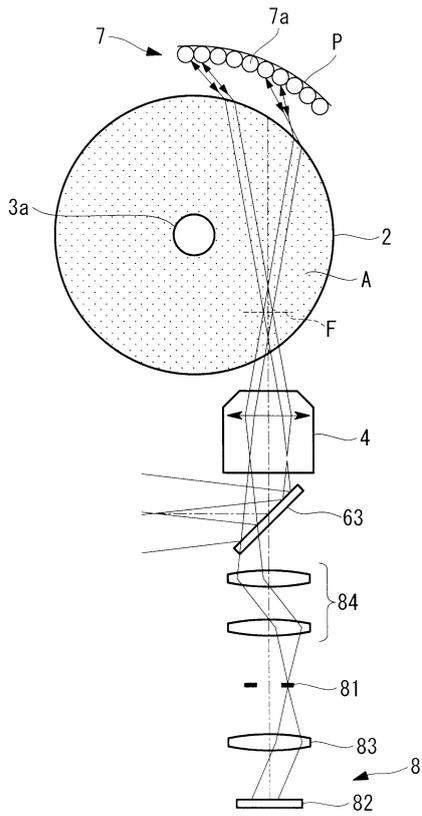


30

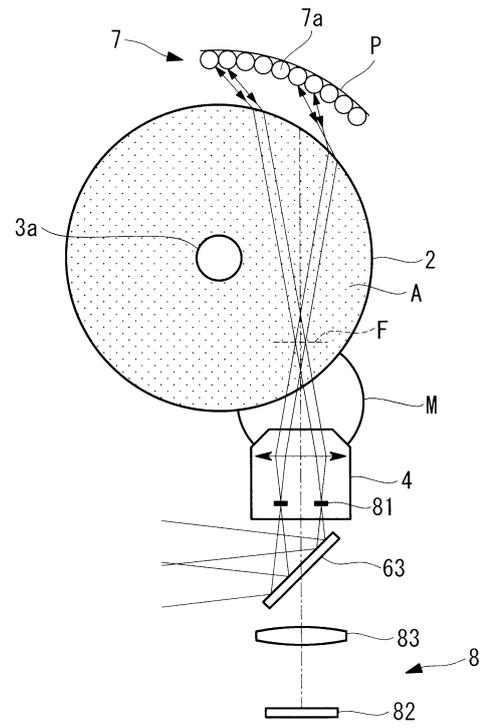
40

50

【図5】



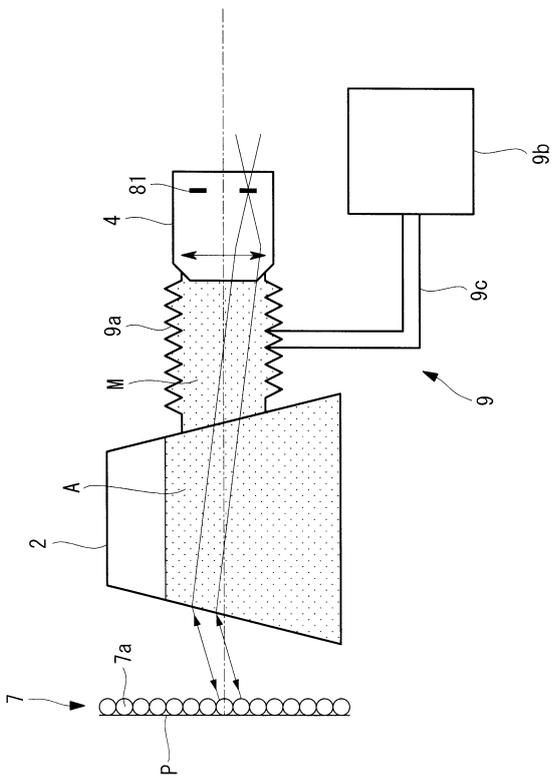
【図6】



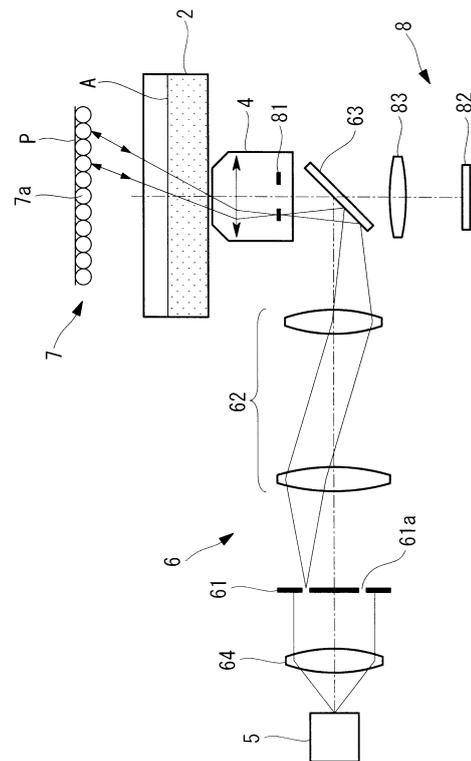
10

20

【図7】



【図8】

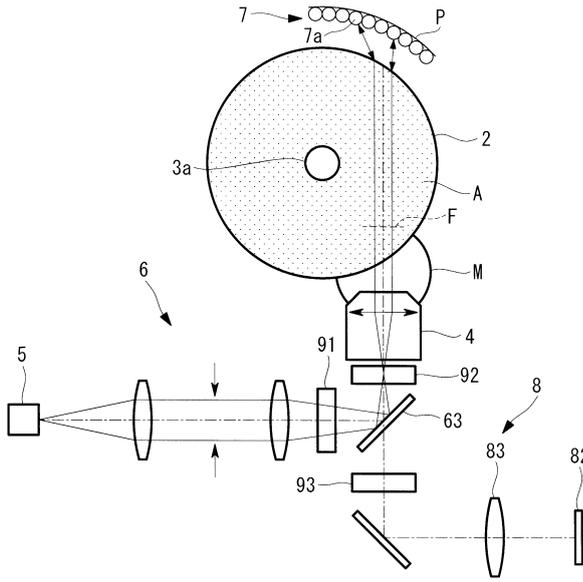


30

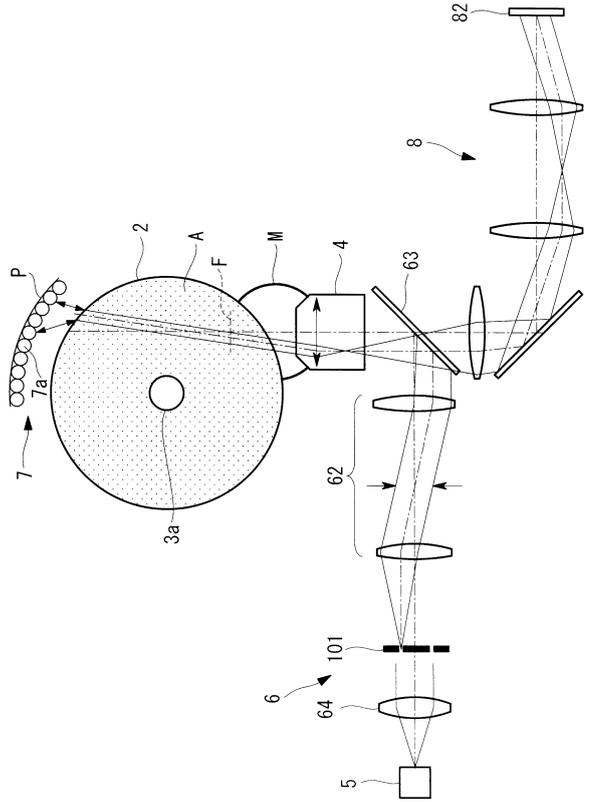
40

50

【図 9】



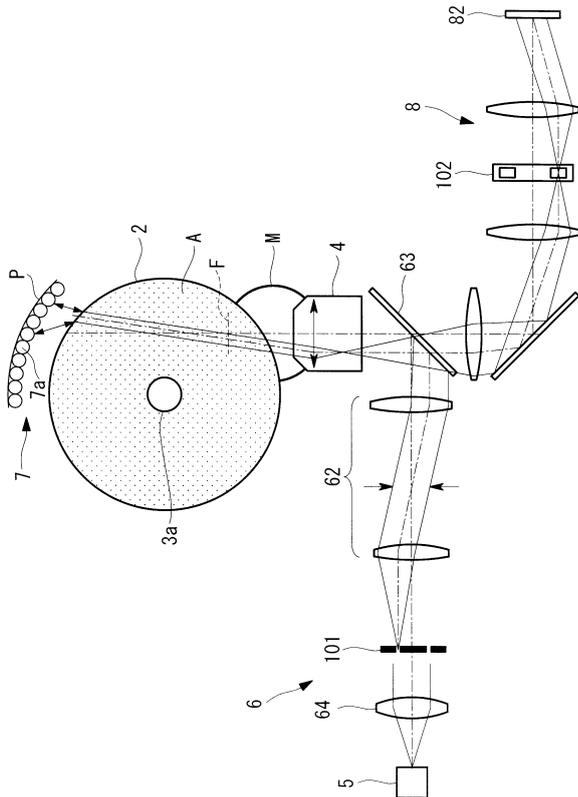
【図 10】



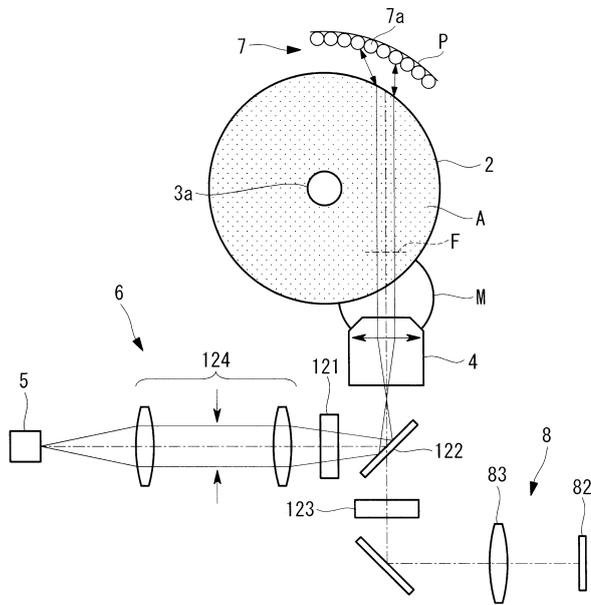
10

20

【図 11】



【図 12】

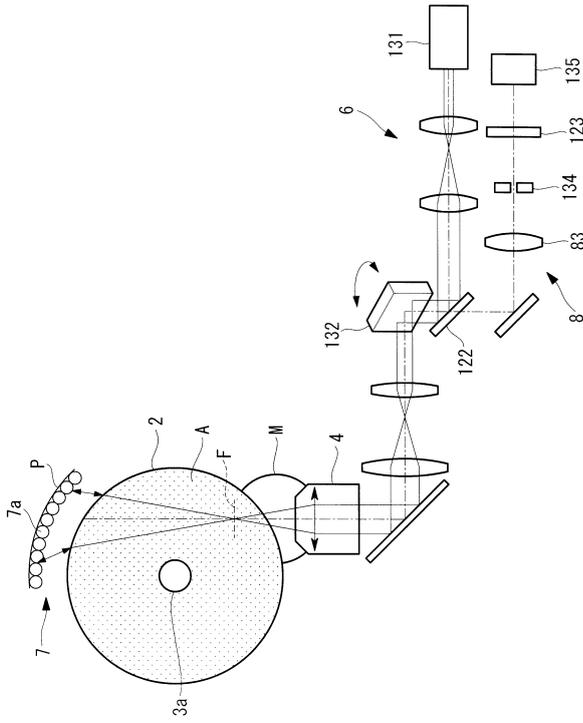


30

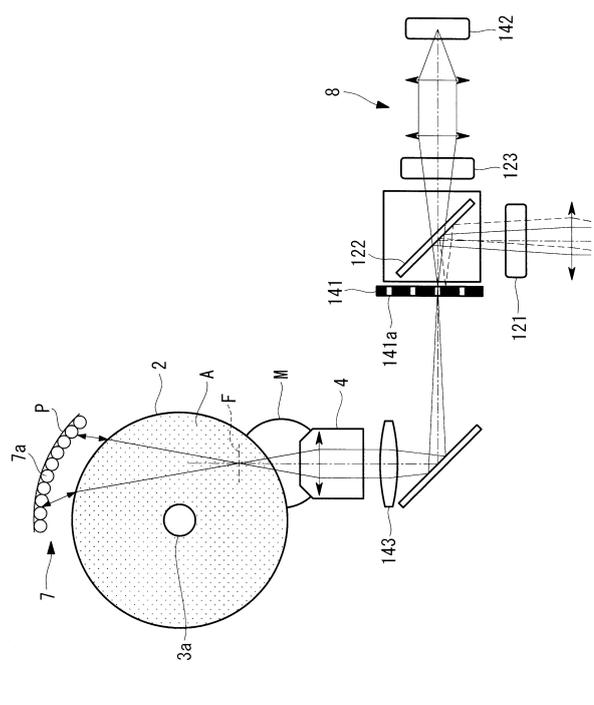
40

50

【図 13】



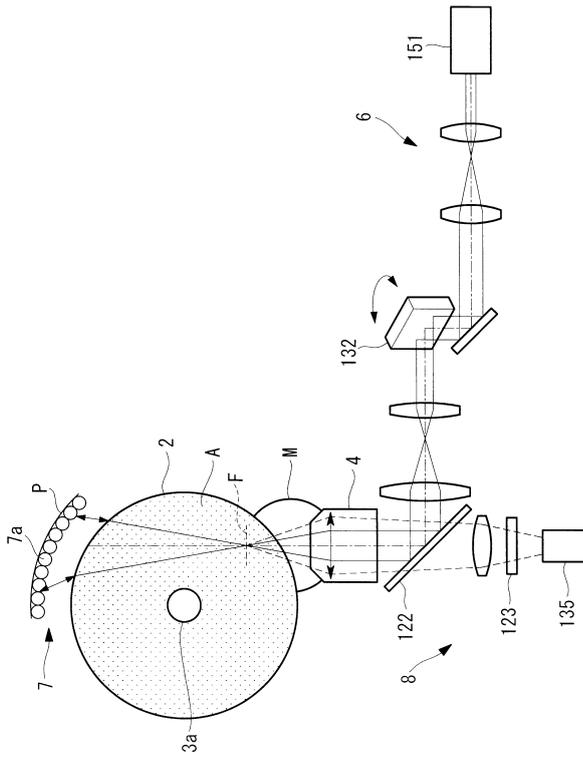
【図 14】



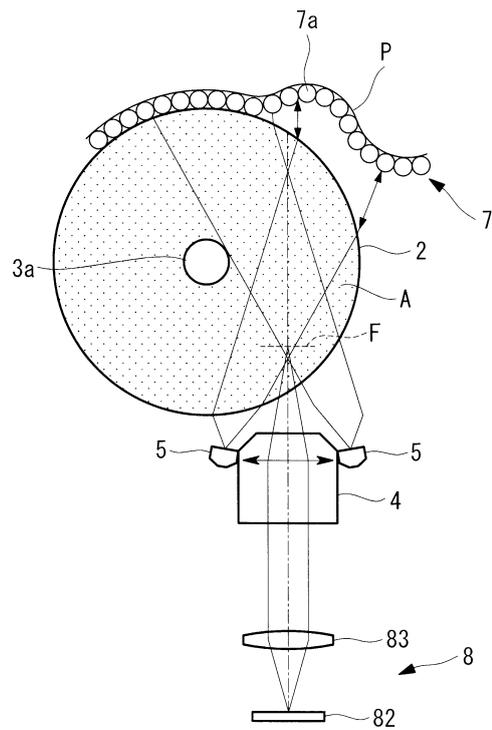
10

20

【図 15】



【図 16 A】

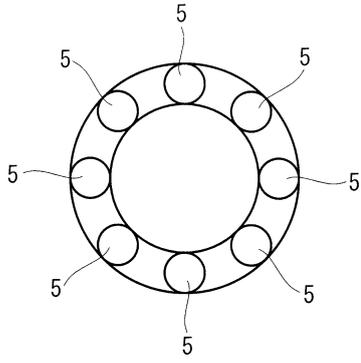


30

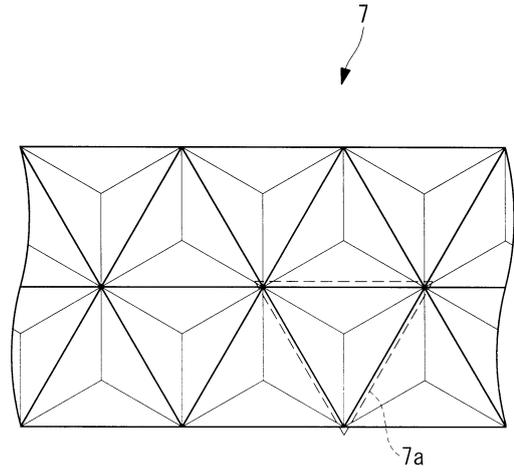
40

50

【図 16 B】

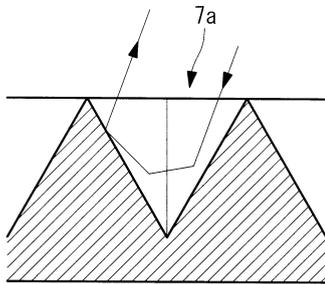


【図 17 A】

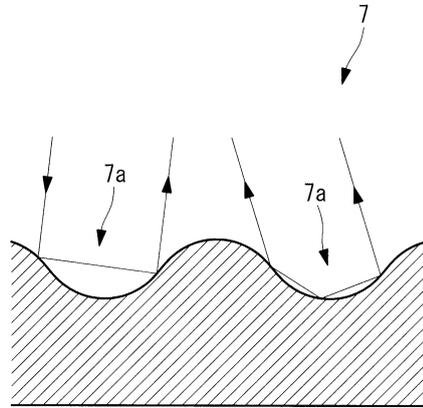


10

【図 17 B】



【図 18】



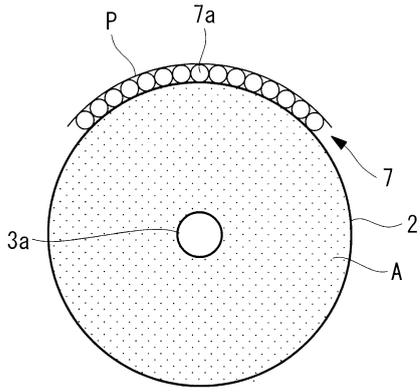
20

30

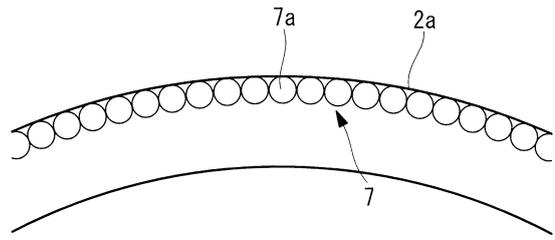
40

50

【図 19 A】

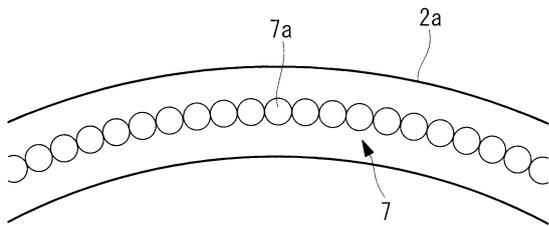


【図 19 B】



10

【図 19 C】



20

30

40

50

フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0140215 (US, A1)

特開2005-241692 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G02B 19/00 - 21/00

G02B 21/06 - 21/36

G01N 21/00 - 21/01

G01N 21/17 - 21/61