

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7109130号
(P7109130)

(45)発行日 令和4年7月29日(2022.7.29)

(24)登録日 令和4年7月21日(2022.7.21)

(51)国際特許分類 F I
G 0 2 B 21/18 (2006.01) G 0 2 B 21/18

請求項の数 16 (全24頁)

(21)出願番号	特願2018-72067(P2018-72067)	(73)特許権者	322004393 株式会社エビデント
(22)出願日	平成30年4月4日(2018.4.4)		
(65)公開番号	特開2019-184684(P2019-184684 A)	(74)代理人	100118913 弁理士 上田 邦生
(43)公開日	令和1年10月24日(2019.10.24)	(74)代理人	100142789 弁理士 柳 順一郎
審査請求日	令和3年3月5日(2021.3.5)	(74)代理人	100201466 弁理士 竹内 邦彦
		(72)発明者	島田 佳弘 東京都八王子市石川町2 9 5 1 番地 オ リンバス株式会社内
		審査官	殿岡 雅仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 顕微鏡

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アレイ状に配列された複数のサンプル容器を有するマイクロプレートを水平方向に移動可能に支持する可動ステージと、

前記マイクロプレートに対して鉛直方向に位置する第1対物レンズを有し、前記サンプル容器に収容されているサンプルの撮像データを取得する第1撮像部と、

前記第1対物レンズよりも倍率が高く、かつ、前記マイクロプレートに対して鉛直方向に位置する第2対物レンズを有し、前記サンプル容器に収容されている前記サンプルの撮像データを取得する第2撮像部と、

前記第1撮像部により得られた前記サンプル容器ごとの前記サンプルの前記撮像データに基づき、前記サンプル容器内における前記サンプルの代表位置を決定する代表位置決定部と、

前記可動ステージにより前記第1撮像部および前記第2撮像部に対して複数の前記サンプル容器を移動させることによって、前記第1撮像部および前記第2撮像部により各前記サンプル容器内の前記サンプルの撮像データを順次取得させる制御部とを備え、

該制御部が、同一の前記サンプル容器内の前記サンプルに対して、前記第1撮像部により前記撮像データを取得させた後に、前記第1撮像部によって得られた前記撮像データに基づいて前記代表位置決定部により決定された前記サンプル容器内における前記サンプルの前記代表位置を前記可動ステージにより前記第2対物レンズの光軸に合わせてから、前記第2撮像部により前記撮像データを取得させ、かつ、前記第2撮像部による前記撮像デ

10

20

ータの取得に同期して、前記第 1 撮像部により別の前記サンプル容器内の前記サンプルの前記撮像データを取得させる顕微鏡。

【請求項 2】

前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器間のピッチの整数倍の距離だけ前記アレイ状の配列方向に間隔をあけて配置される請求項 1 に記載の顕微鏡。

【請求項 3】

前記サンプル容器が、 m 個 \times n 個、かつ、 $m > n$ の 2 次元的な配列状態で前記可動ステージにより支持され、

前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器が m 個配列される方向に間隔をあけて配置される請求項 1 に記載の顕微鏡。

10

【請求項 4】

前記サンプルに照明光を照射することによって、前記第 1 撮像部に向けて前記第 1 対物レンズの光軸に沿って照明光を前記サンプルに透過させる透過照明装置を備える請求項 2 または請求項 3 に記載の顕微鏡。

【請求項 5】

前記サンプルに照明光を照射することによって、前記第 1 撮像部に向けて前記第 1 対物レンズの光軸に沿って前記照明光を前記サンプルにおいて反射させる反射照明装置を備える請求項 1 から請求項 4 のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項 6】

前記第 1 対物レンズの光軸に対して角度をつけて前記サンプルに前記照明光を照射することによって、前記サンプルを偏射照明する請求項 4 または請求項 5 に記載の顕微鏡。

20

【請求項 7】

前記第 2 対物レンズが鉛直上方に光軸を向けて配置される請求項 1 から請求項 6 のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項 8】

前記第 1 対物レンズが鉛直下方に光軸を向けて配置される請求項 7 に記載の顕微鏡。

【請求項 9】

前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器の配列方向に該サンプル容器 1 つ分だけ距離をあけて配置される請求項 8 に記載の顕微鏡。

30

【請求項 10】

前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、互いに 4 . 5 mm、9 mm または 18 mm 離れて配置される請求項 1 から請求項 8 のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項 11】

前記第 2 撮像部が、像倍率を変更する変倍機能を有する請求項 1 から請求項 10 のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項 12】

前記第 2 撮像部が、前記サンプル上で照明光を走査させる走査部を備え、

該走査部が、前記照明光の走査域を変更することによって前記変倍機能を実現する請求項 11 に記載の顕微鏡。

40

【請求項 13】

前記第 1 撮像部により取得された前記撮像データに基づいて、前記水平方向に沿う平面内における前記サンプルの大きさ情報を取得し、取得した前記大きさ情報に基づいて、前記像倍率を調整する像倍率調整部を備える請求項 11 または請求項 12 に記載の顕微鏡。

【請求項 14】

前記第 2 撮像部が、撮像画素数を変更する撮像画素数変更手段を備える請求項 1 から請求項 13 のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項 15】

前記第 1 撮像部により取得された前記撮像データに基づいて、前記水平方向に沿う平面内における前記サンプルの大きさ情報を取得し、取得した前記大きさ情報に基づいて球面

50

収差補正值を決定する補正值決定部と、

該補正值決定部により決定された前記球面収差補正值に従って、前記第2対物レンズの球面収差を補正する球面収差補正部とを備える請求項1から請求項14のいずれかに記載の顕微鏡。

【請求項16】

前記補正值決定部が、前記第2撮像部により、前記サンプルの3次元的な前記撮像データを取得する場合において、前記サンプルにおける鉛直方向の位置に応じて前記球面収差補正值を修正する請求項15に記載の顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、顕微鏡に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、スフェロイドやオルガノイド等の3次元培養細胞の顕微鏡画像データを取得した後、取得した顕微鏡画像データに対して画像解析技術を用いてスクリーニングを行うことによって、薬効を評価する方法が注目されている。また、近年、3次元培養細胞を構成する個々の細胞の細胞内小器官を解析することが求められており、必然的に解像度の高い画像が要求されている。

【0003】

20

一方で、細胞スクリーニングでは、大量のストレージに必要なコストや、データ解析のためのコストを削減することが求められており、解析に必用な分解能が得られるという条件において、画像データ量を決定する撮像画素数は可能な限り少ないことが望まれている。したがって、撮像画素数と撮像領域とにより決定される画素ピッチ上の分解能は、光学的な分解能を勘案して適切に設定されなければならない。

【0004】

高解像度の必要性に関しては、これまでの2次元培養細胞の解析、換言すれば単層細胞の解析においても求められていた。しかしながら、2次元培養細胞の撮像では、細胞がウエルの底面の全領域に存在しているため、ウエルの底面よりも小さな撮像領域によって1箇所または所定の複数箇所を撮影することによって、得られた撮像データを統計解析に供すればよい。そのため、撮像位置の正確さが求められるようなことはなかった。

30

【0005】

これに対し、マイクロプレートのウエルに収容されているスフェロイド等のサンプルを高解像で撮像し、かつ、サンプルが写っていない無駄なピクセルデータの蓄積を回避するためには、顕微鏡の視野内にスフェロイド全体が入るように設定した上で、可能な限り高倍率によって撮影することが重要となる。これには、高解像度の画像を取得する前に、スフェロイドの代表位置、換言すればスフェロイドの中心位置を予め正確に検出しておき、撮像時にスフェロイドの代表位置を対物レンズの光軸に合わせる必要がある。

【0006】

上述した課題を解決する手段として、切替え装置に低倍の対物レンズと高倍の対物レンズを装着し、低倍対物レンズによりウエル全域のサンプルを撮影することによって目的の撮像位置を決定し、その後、高倍対物レンズに切り替えてから、高解像の撮像を行う方法が知られている（例えば、特許文献1参照。）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】特表2000-509827号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

50

しかしながら、特許文献 1 に記載の方法は、低倍の対物レンズを用いて全てのウエル内のサンプルを順に撮像した後に、高倍の対物レンズを用いて全てのウエルに対して順にサンプルを撮像していくため、スループットが低くなるという問題がある。

【0009】

本発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、複数のサンプルの高解像の撮像データを高スループットで取得することができる顕微鏡を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記目的を達成するために、本発明は以下の手段を提供する。

本発明の第 1 態様は、アレイ状に配列された複数のサンプル容器を有するマイクロプレートを水平方向に移動可能に支持する可動ステージと、前記マイクロプレートに対して鉛直方向に位置する第 1 対物レンズを有し、前記サンプル容器に收容されているサンプルの撮像データを取得する第 1 撮像部と、前記第 1 対物レンズよりも倍率が高く、かつ、前記マイクロプレートに対して鉛直方向に位置する第 2 対物レンズを有し、前記サンプル容器に收容されている前記サンプルの撮像データを取得する第 2 撮像部と、前記第 1 撮像部により得られた前記サンプル容器ごとの前記サンプルの前記撮像データに基づき、前記サンプル容器内における前記サンプルの代表位置を決定する代表位置決定部と、前記可動ステージにより前記第 1 撮像部および前記第 2 撮像部に対して複数の前記サンプル容器を移動させることによって、前記第 1 撮像部および前記第 2 撮像部により各前記サンプル容器内の前記サンプルの撮像データを順次取得させる制御部とを備え、該制御部が、同一の前記サンプル容器内の前記サンプルに対して、前記第 1 撮像部により前記撮像データを取得させた後に、前記第 1 撮像部によって得られた前記撮像データに基づいて前記代表位置決定部により決定された前記サンプル容器内における前記サンプルの前記代表位置を前記可動ステージにより前記第 2 対物レンズの光軸に合わせてから、前記第 2 撮像部により前記撮像データを取得させ、かつ、前記第 2 撮像部による前記撮像データの取得に同期して、前記第 1 撮像部により別の前記サンプル容器内の前記サンプルの前記撮像データを取得させる顕微鏡である。

【0011】

本態様によれば、同一のサンプル容器内のサンプルに対して、高倍の第 2 対物レンズを有する第 2 撮像部に先立って、低倍の第 1 対物レンズを有する第 1 撮像部により撮像データが取得される。これにより、代表位置決定部によって、そのサンプル容器に收容されているサンプルの代表位置を容易かつ確実に決定することができる。そして、代表位置決定部によりそのサンプルの代表位置が決定されると、可動ステージによりそのサンプルの代表位置が第 2 対物レンズの光軸に合わせられた状態で、第 2 撮像部により撮像データが取得される。これにより、第 2 撮像部によって、サンプルが十分に写っていない無駄な撮像データを抑制することができ、サンプルの高解像の撮像データを効率的に取得することができる。

【0012】

この場合において、制御部が、第 2 撮像部による撮像データの取得に同期して、第 1 撮像部により別のサンプル容器内のサンプルの撮像データを取得させることによって、第 1 撮像部により全てのサンプルの撮像データを取得してから第 2 撮像部により全てのサンプルに対して撮像データを取得していく場合と比較して、第 1 撮像部による撮像データの取得と第 2 撮像部による撮像データの取得とが時間的に重複されて行われる分だけ、スループットを向上することができる。これにより、複数のサンプルの高解像の撮像データを高スループットで取得することができる。

【0013】

上記態様においては、前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器間のピッチの整数倍の距離だけ前記アレイ状の配列方向に間隔をあけて配置されることとしてもよい。

この構成によって、第 1 撮像部および第 2 撮像部により、サンプル容器間のピッチの整

10

20

30

40

50

数倍の分だけ離れた異なるサンプル容器内のサンプルの撮像データを互いに同期して取得することができる。

【0014】

上記態様においては、前記サンプル容器が、 m 個 \times n 個、かつ、 $m > n$ の2次元的な配列状態で前記可動ステージにより支持され、前記第1対物レンズの光軸と前記第2対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器が m 個配列される方向に間隔をあけて配置されることとしてもよい。

【0015】

この構成によって、第1撮像部による撮像データの取得と第2撮像部による撮像データの取得とが同期せずに行われる回数を低減することができる。すなわち、上記構成によれば、 m 個配列されているサンプル容器のうち、一方の端側に配置されているサンプル容器のサンプルについては、第2撮像部と同期せずに先に第1撮像部だけで撮像データを取得しておき、他方の端側に配置されているサンプル容器のサンプルについては、第1撮像部と同期せずに第2撮像部だけで撮像データを取得することになるが、第1撮像部および第2撮像部の一方だけにより撮像データを取得するサンプル容器がそれぞれ n 個だけで済む。したがって、第1撮像部および第2撮像部の一方だけによる撮像データの取得にかかる時間をより短くすることができる。

10

【0016】

上記態様においては、前記サンプルに照明光を照射することによって、前記第1撮像部に向けて前記第1対物レンズの光軸に沿って照明光を前記サンプルに透過させる透過照明装置を備えることとしてもよい。

20

この構成によって、透過照明装置および第1撮像部により、サンプルを透過照明観察することができる。

【0017】

上記態様においては、前記サンプルに照明光を照射することによって、前記第1撮像部に向けて前記第1対物レンズの光軸に沿って前記照明光を前記サンプルにおいて反射させる反射照明装置を備えることとしてもよい。

この構成によって、反射照明装置および第1撮像部により、サンプルを反射照明観察することができる。

【0018】

上記態様においては、前記第1対物レンズの光軸に対して角度をつけて前記サンプルに前記照明光を照射することによって、前記サンプルを偏射照明することとしてもよい。

30

この構成によって、コントラストの高い良好な撮像データを取得することができる。

【0019】

上記態様においては、前記第2対物レンズが鉛直上方に光軸を向けて配置されることとしてもよい。

この構成によって、サンプル容器に収容されているサンプルに対して、第2対物レンズをより近い位置に配置することができる。これにより、第1対物レンズと比較して作動距離が短い第2対物レンズを用いたサンプルの撮像データの取得を容易にすることができる。

【0020】

上記態様においては、前記第1対物レンズが鉛直下方に光軸を向けて配置されることとしてもよい。

40

この構成によって、第1対物レンズと第2対物レンズとを互いに邪魔せずに配置することができる。

【0021】

上記態様においては、前記第1対物レンズの光軸と前記第2対物レンズの光軸とが、前記サンプル容器の配列方向に該サンプル容器1つ分だけ距離をあけて配置されることとしてもよい。

この構成によって、第1撮像部と第2撮像部により、互いに隣接するサンプル容器内のサンプルの撮像データを同期して取得することができる。

50

【 0 0 2 2 】

上記態様においては、前記第 1 対物レンズの光軸と前記第 2 対物レンズの光軸とが、互いに 4 . 5 mm、9 mm または 1 8 mm 離れて配置されることとしてもよい。

この構成によって、複数のサンプル容器として、複数のウエルが互いに 4 . 5 mm、9 mm または 1 8 mm のピッチをあけて配列されてなる一般的なマイクロプレートを採用する場合において、いずれのマイクロプレートにも対応することができる。

【 0 0 2 3 】

上記態様においては、前記第 2 撮像部が、像倍率を変更する変倍機能を有することとしてもよい。

この構成によって、変倍機能により、第 2 撮像部による撮像領域をサンプルの大きさに合わせるができる。これにより、撮像データにおいてサンプルが写っていない範囲を低減することができる。

10

【 0 0 2 4 】

上記態様においては、前記第 2 撮像部が、前記サンプル上で照明光を走査させる走査部を備え、該走査部が、前記照明光の走査域を変更することによって前記変倍機能を実現することとしてもよい。

この構成によって、走査部を利用して変倍機能を効率的に実現することができる。

【 0 0 2 5 】

上記態様においては、前記第 1 撮像部により取得された前記撮像データに基づいて、前記水平方向に沿う平面内における前記サンプルの大きさ情報を取得し、取得した前記大きさ情報に基づいて、前記像倍率を調整する像倍率調整部を備えることとしてもよい。

20

この構成によって、像倍率調整部により、光学分解能に対して、撮像画素数と撮像領域とにより決定される画素ピッチ上の分解能を向上することができる。

【 0 0 2 6 】

上記態様においては、前記第 2 撮像部が、撮像画素数を変更する撮像画素数変更手段を備えることとしてもよい。

この構成によって、撮像画素数変更手段により、撮像画素数と撮像領域とにより決定される画素ピッチ上の分解能を適切に設定することができる。

【 0 0 2 7 】

上記態様においては、前記第 1 撮像部により取得された前記撮像データに基づいて、前記水平方向に沿う平面内における前記サンプルの大きさ情報を取得し、取得した前記大きさ情報に基づいて球面収差補正值を決定する補正值決定部と、該補正值決定部により決定された前記球面収差補正值に従って、前記第 2 対物レンズの球面収差を補正する球面収差補正部とを備えることとしてもよい。

30

この構成によって、第 2 撮像部により取得される撮像データの質を向上することができる。

【 0 0 2 8 】

上記態様においては、前記補正值決定部が、前記第 2 撮像部により、前記サンプルの 3 次元的な前記撮像データを取得する場合において、前記サンプルにおける鉛直方向の位置に応じて前記球面収差補正值を修正することとしてもよい。

40

この構成によって、球面収差が補正された良質なサンプルの 3 次元的な撮像データを取得することができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 9 】

本発明によれば、複数のサンプルの高解像の撮像データを高スループットで取得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 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 本発明の第 1 実施形態に係る顕微鏡装置の概略構成図である。

【 図 2 】 図 1 の顕微鏡装置により使用するマイクロプレートを鉛直上方から見た図である。

50

【図 3】第 1 撮像部のみによる撮像データの取得を説明するフローチャートである。

【図 4】第 1 撮像部と第 2 撮像部とが同期して行う撮像データの取得を説明するフローチャートである。

【図 5】第 2 撮像部のみによる撮像データの取得を説明するフローチャートである。

【図 6】第 1 撮像部によるウエルの撮影順序の一例を示した図である。

【図 7】第 2 撮像部によるウエルの撮影順序の一例を示した図である。

【図 8】本発明の第 2 実施形態に係る顕微鏡装置の概略構成図である。

【図 9】本発明の第 3 実施形態に係る顕微鏡装置の概略構成図である。

【図 10】図 9 の顕微鏡装置によるウエルの撮影順序の一例を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

〔第 1 実施形態〕

本発明の第 1 実施形態に係る顕微鏡装置（顕微鏡）について、図面を参照して以下に説明する。

本実施形態に係る顕微鏡装置 1 は、図 1 に示すように、アレイ状に配列された複数のウエル（サンプル容器）W を有するマイクロプレート 13 を水平方向に移動可能に支持する可動ステージ 3 と、各ウエル W に収容されているスフェロイド（サンプル）S の撮像データを取得する第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 と、スフェロイド S ごとに中心位置（代表位置）を決定するコンピュータ（代表位置決定部）9 と、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 により各ウエル W 内のスフェロイド S の撮像データを順次取得させる制御器（制御部）11 とを備えている。

【0032】

スフェロイド S は、蛍光標識されている。スフェロイド S の直径は、例えば、約 200 μm である。

【0033】

マイクロプレート 13 は、例えば、図 2 に示すように、縦横に等間隔で配列された m 個 \times n 個（ $i = 1 \sim m$ 、 $j = 1 \sim n$ ）、かつ、 $m > n$ のウエル W を有している。例えば、マイクロプレート 13 は、ウエル数が $12 \times 8 = 96$ 個（ $i = 1 \sim 12$ 、 $j = 1 \sim 8$ ）で、ウエルピッチ、すなわち縦横に隣接する 2 つのウエル W の中心の間隔が 9 mm である。

【0034】

各ウエル W は、光学的に透明な材質により構成され、一端に底部を有する有底円筒状に形成されている。ウエル W の底部の上面を底面 W a という。本実施形態においては、底面 W a が直径約 1 mm の大きさを有することとする。これらウエル W は、深さ方向の途中位置から底面 W a に向かって次第に先細になる斜面 W b を有している。各ウエル W には、培養液 C とともにスフェロイド S が 1 つずつ収容されている。

【0035】

液滴を吊り下げた状態からなるハンギングドロップ内で形成したスフェロイド S をハンギングドロップとともにウエル W 内に落下させることによって、スフェロイド S がウエル W の斜面 W b を滑り落ちてから底面 W a に着地する。スフェロイド S の直径は約 200 μm なので、最終的に底面 W a のどこに着地するかは決まっておらず、ウエル W の底面 W a の中央に着地するときもあれば、底面 W a における周辺に着地するときもある。

【0036】

可動ステージ 3 は、マイクロプレート 13 を水平に載置した状態で固定する。以下、可動ステージ 3 によりマイクロプレート 13 が水平に支持された状態で、ウエル W が 12 個配列されている方向を X 方向とし、ウエル W が 8 個配列されている方向を Y 方向とする。

【0037】

この可動ステージ 3 は、図示しないモータを備えており、電動によってマイクロプレート 13 を X 方向および Y 方向に移動させることができる。以下、X 方向および Y 方向に直交する鉛直方向を Z 方向とする。

【0038】

10

20

30

40

50

第1撮像部5は、可動ステージ3により支持されるマイクロプレート13の上方に配置される。この第1撮像部5は、鉛直下方に向けて配置された4倍の倍率を有する低倍対物レンズ(第1対物レンズ)21と、低倍対物レンズ21をZ方向に移動させる照準部23と、反射ミラー25と、ハーフミラー27と、結像レンズ29と、カメラ31とを備えている。低倍対物レンズ21の光軸は、装置の高さを抑えるために反射ミラー25によって折り曲げられている。

【0039】

照準部23は、ウエルWの底面Waから略100 μ mのZ位置に焦点を合わせる。低倍対物レンズ21は、NA、すなわち開口数が小さいため、それぞれのスフェロイドSに焦点を合わせなくても、スフェロイドSの位置と直径とを決定するのに十分な焦点深度を有している。スフェロイドSの大きさが全く未知で、しかも大きさのばらつきが大きい場合は、例えば、コントラスト法により、照準部23を駆動することによってスフェロイドSの直径を鮮明にしてもよい。

【0040】

カメラ31は、例えば、CCDカメラである。このカメラ31は、低倍対物レンズ21および結像レンズ29との組み合わせにより、約2 \times 2mmの撮像領域を確保することができる。したがって、ウエルWの底面Waの最外縁部を低倍対物レンズ21の光軸上に合わせたとしても、ウエルWの全領域を撮影することができる。

【0041】

第1撮像部5には、スフェロイドSに照明光を照射することによって、スフェロイドSにおいて第1撮像部5に向けて低倍対物レンズ21の光軸に沿って照明光を反射させる反射照明装置33が接続されている。反射照明装置33は、照明光を発生するハロゲンランプ35と、ハロゲンランプ35から発せられた照明光を集光することによってハーフミラー27に入射させる集光レンズ37とを備えている。

【0042】

これら反射照明装置33および第1撮像部5においては、ハロゲンランプ35から発せられた照明光は、集光レンズ37により集光されてハーフミラー27により反射された後、反射ミラー25により反射されて低倍対物レンズ21によりウエルW内のスフェロイドSに対して鉛直上方から照射される。照明光が照射されることによりスフェロイドSにおいて反射された反射光は、低倍対物レンズ21により集光されて照明光の光路を戻り、反射ミラー25により反射されてハーフミラー27を透過した後、結像レンズ29により集光されてカメラ31により撮影される。

【0043】

第2撮像部7は、例えば、共焦点顕微鏡によって構成されており、可動ステージ3により支持されるマイクロプレート13の下方に配置される。この第2撮像部7は、鉛直上方に向けて配置された25倍の倍率を有する高倍対物レンズ(第2対物レンズ)39と、高倍対物レンズ39をZ方向に移動させる照準部41と、結像レンズ43と、瞳投影レンズ45と、XYガルバノミラーズキャナ47と、レーザ光(照明光)を発生するレーザ49と、ダイクロイックミラー51と、共焦点レンズ53と、ピンホール55と、光電子増倍管等の光検出器57とを備えている。

【0044】

高倍対物レンズ39は、例えば、液浸対物レンズである。この高倍対物レンズ39には、球面収差を補正する補正環(球面収差補正部)59が設けられている。補正環59は、補正環59を回転駆動させる補正環駆動装置61に接続されている。

ダイクロイックミラー51は、レーザ49から発せられたレーザ光を反射する一方、スフェロイドSから発せられる蛍光を透過させる。

【0045】

XYガルバノミラーズキャナ47は、レーザ光の走査域を変更することによって像倍率を変更する変倍機能として機能する。XYガルバノミラーズキャナ47の図示しないミラーの走査角度を制御することにより、レーザ光の走査域を変更することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

光検出器 5 7 は、撮像画素数を変更する撮像画素数変更手段として機能する。すなわち、X Y ガルバノミラースキャナ 4 7 によるレーザ光の走査に対して、光検出器 5 7 による光検出の分割時間を変更することにより、撮像画素数を変更できる。X Y ガルバノミラースキャナ 4 7 および光検出器 5 7 により、撮像画素数と撮像領域とによって決定される画素ピッチ上の分解能と光学的な分解能とを適切に設定することができる。

【 0 0 4 7 】

第 2 撮像部 7 には、高倍対物レンズ 3 9 とウエル W の底部との間に純水等の液体 L を給水するための給液装置 6 3 が備えられている。給液装置 6 3 は、高倍対物レンズ 3 9 とウエル W の底部との間に液体 L を供給する流路および高倍対物レンズ 3 9 とウエル W の底部との間から液体 L を排出する流路を形成するペローズ 6 5 およびカバー部 6 7 と、液体 L を貯留しておく給水タンク 6 9 と、給水タンク 6 9 内の液体 L をペローズ 6 5 およびカバー部 6 7 の流路を経由して高倍対物レンズ 3 9 とウエル W の底部との間に供給するポンプ 7 1 と、ペローズ 6 5 およびカバー部 6 7 の流路から液体 L を排出する配管 7 3 と、配管 7 3 を経由して排出された液体 L を収容する排液タンク 7 5 とを備えている。

10

【 0 0 4 8 】

この給液装置 6 3 は、高倍対物レンズ 3 9 がウエル W の底面 W a を隔ててスフェロイド S に対向して配置されたときに、給水することによって、高倍対物レンズ 3 9 の先端レンズ（図示略）とウエル W の底部との間に液体 L を貯留させる。給水は、高倍対物レンズ 3 9 が新たなスフェロイド S に対向する度に行われる必要はなく、適宜省略してもよい。

20

【 0 0 4 9 】

また、第 2 撮像部 7 には、図示しない赤外レーザを搭載した位相差式のオートフォーカス装置 7 7 と、オートフォーカス装置 7 7 の赤外レーザから発せられた赤外光を反射する一方、可視光を透過させるダイクロイックミラー 7 9 とが備えられている。

【 0 0 5 0 】

ダイクロイックミラー 7 9 は、高倍対物レンズ 3 9 の光軸上であって、高倍対物レンズ 3 9 と結像レンズ 4 3 との間に配置されている。オートフォーカス装置 7 7 は、ウエル W の底面 W a を検出する。そして、オートフォーカス装置 7 7 は、照準部 4 1 を駆動することにより、ウエル W の底面 W a に高倍対物レンズ 3 9 の焦点を合わせる。

【 0 0 5 1 】

この第 2 撮像部 7 においては、レーザ 4 9 から発せられたレーザ光は、ダイクロイックミラー 5 1 により反射されて、X Y ガルバノミラースキャナ 4 7 により 2 次元的に走査された後、瞳投影レンズ 4 5、結像レンズ 4 3 およびダイクロイックミラー 7 9 を透過して、高倍対物レンズ 3 9 によりウエル W 内のスフェロイド S に対して鉛直下方から照射される。レーザ光が照射されることによりスフェロイド S において発せられる蛍光は、高倍対物レンズ 3 9 により集光されてレーザ光の光路を戻り、ダイクロイックミラー 7 9、結像レンズ 4 3 および瞳投影レンズ 4 5 を透過した後、X Y ガルバノミラースキャナ 4 7 を経由してダイクロイックミラー 5 1 を透過し、共焦点レンズ 5 3 により集光される。そして、ピンホール 5 5 を通過した蛍光が光検出器 5 7 により検出される。

30

【 0 0 5 2 】

上述した第 1 撮像部 5 の低倍対物レンズ 2 1 の光軸と第 2 撮像部 7 の高倍対物レンズ 3 9 の光軸は、ウエルピッチ 1 つ分 ($N = 1$) だけ離れて配置される。より具体的には、これら低倍対物レンズ 2 1 の光軸と高倍対物レンズ 3 9 の光軸は、互いに X 方向にウエル W 1 つ分だけ距離をあけて配置される。

40

【 0 0 5 3 】

コンピュータ 9 は、演算部としての CPU（中央処理部）を備え、光検出器 5 7 により取得された撮像データに基づいて、スフェロイド S の画像を生成する。また、コンピュータ 9 は、カメラ 3 1 により取得されたウエル W ごとおよびスフェロイド S の撮像データに基づいて、スフェロイド S ごとに中心位置を決定する。また、コンピュータ 9 は、スフェロイド S の直径を計測し、スフェロイド S が球体であることを前提として、計測した直径に基

50

づいて球面収差補正値を決定する。また、コンピュータ 9 は、第 2 撮像部 7 により撮像データを取得する場合において、スフェロイド S の Z 方向の観察位置に応じて、球面収差補正値を修正する。

【 0 0 5 4 】

制御器 1 1 は、例えば、CPU (Central Processing Unit) と、ROM (Read Only Memory) および RAM (Random Access Memory) 等の主記憶部と、HDD (Hard Disk Drive) 等の補助記憶部と、データを出力する出力部と、外部機器との間で種々のデータのやりとりを行う外部インターフェース等 (いずれも図示略) を備えている。補助記憶部には各種プログラムが格納されており、CPU が補助記憶部からプログラムを RAM 等の主記憶部に読み出して、そのプログラムを実行することにより、可動ステージ 3

10

【 0 0 5 5 】

例えば、制御器 1 1 は、駆動プログラムの実行により、可動ステージ 3 を駆動することによって、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 に対してマイクロプレート 1 3 を X 方向および Y 方向に移動させる。これにより、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 により撮像データを取得するウエル W のスフェロイド S を変更する。また、制御器 1 1 は、収差補正プログラムの実行により、コンピュータ 9 によって決定されたスフェロイド S の球面収差補正値に基づいて、補正環駆動装置 6 1 を制御する。これにより、補正環駆動装置 6 1 によって、補正環 5 9 が駆動される。

20

【 0 0 5 6 】

また、制御器 1 1 は、撮像プログラムの実行により、同一のウエル W 内のスフェロイド S に対して、第 2 撮像部 7 に先立って、第 1 撮像部 5 により撮像データを取得させる。そして、同一のウエル W 内のスフェロイド S に対して、第 1 撮像部 5 によって取得した撮像データに基づいて、コンピュータ 9 によりそのスフェロイド S の中心位置を決定させるとともに、コンピュータ 9 による決定に基づいて可動ステージ 3 を駆動することによって、そのスフェロイド S の中心位置を高倍対物レンズ 3 9 の光軸に合わせてから、第 2 撮像部 7 によりそのスフェロイド S の撮像データを取得させる。また、制御器 1 1 は、第 2 撮像部 7 による撮像データの取得に同期して、第 1 撮像部 5 により別のウエル W 内のスフェロイド S の撮像データを取得させる。

30

【 0 0 5 7 】

上記構成の顕微鏡装置 1 の作用について、図 3 ~ 図 5 のフローチャートを参照して説明する。本実施形態において採用するマイクロプレート 1 3 は、ウエル数が $12 \times 8 = 96$ 個 ($i = 1 \sim 12$, $j = 1 \sim 8$) であるので、 $m = 12$, $n = 8$ である。また、低倍対物レンズ 2 1 の光軸と高倍対物レンズ 3 9 の光軸の間隔 (N) は $N = 1$ である。

【 0 0 5 8 】

本実施形態に係る顕微鏡装置 1 によりマイクロプレート 1 3 の各ウエル W に収容されているスフェロイド S を観察するには、図 3 のフローチャートに示されるように、まず、第 1 撮像部 5 により、ウエル W ($i = 1$, $j = 1$) からウエル W ($i = 1$, $j = 8$) まで先読みする。

40

【 0 0 5 9 】

具体的には、まず、制御器 1 1 により、 $i = 1$, $j = 1$ が設定される (ステップ SA 1)。次いで、制御器 1 1 により可動ステージ 3 が駆動されることによって、ウエル W ($i = 1$, $j = 1$) の中心位置が第 1 撮像部 5 の低倍対物レンズ 2 1 の光軸上に配置される (ステップ SA 2)。そして、第 1 撮像部 5 によってウエル W ($i = 1$, $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データが取得される (ステップ SA 3)。

【 0 0 6 0 】

第 1 撮像部 5 により取得されたウエル W ($i = 1$, $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データはコンピュータ 9 に送られ、コンピュータ 9 により画像処理されることによって、ス

50

フェロイドSの中心位置が決定される。また、コンピュータ9により、スフェロイドSの直径も計測され、計測した直径に基づいて球面収差補正值が決定される(ステップSA4)。

【0061】

次いで、制御器11により、現在の設定が $i = \text{偶数}$ か否かが判断される(ステップSA5)。また、制御器11により、現在の設定が、 $j = n$ か否か(ステップSA6)または $j = 1$ か否か(ステップSA7)が判断される。現在の設定は $i = 1$ 、 $j = 1$ であり、 $i = \text{偶数}$ ではなく(ステップSA5「NO」)、また、 $j = n$ でもない(ステップSA6「NO」)、制御器11により、 $j = j + 1$ 、すなわちこの場合は $i = 1$ 、 $j = 2$ に設定が変更されて、ステップSA2に戻る。

10

【0062】

そして、可動ステージ3により、マイクロプレート13がY方向に移動されることによって、図6に示すように、ウエルW($i = 1$ 、 $j = 2$)~ウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)まで、ウエルW($i = 1$ 、 $j = 1$)と同様にして、それぞれステップSA2~SA6が順に実施される。

【0063】

ウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)までステップSA2~SA6が実施されると、すなわち、設定が $i = 1$ 、 $j = 8$ まで変更されると、 $j = n$ を満たすことから(ステップSA6「YES」)、制御器11により、現在の設定が $i = N$ か否かが判断される(ステップSA8)。本実施形態においては低倍対物レンズ21の光軸と高倍対物レンズ39の光軸の間隔(N)が $N = 1$ であるから(ステップSA8「YES」)、先読みは終了する。

20

【0064】

次に、図4に示すフローチャートに示されるように、制御器11により、 $i = i + 1$ 、すなわちこの場合は $i = 2$ 、 $j = 8$ に設定される(ステップSB1)。そして、以下の2つのプロセスにおいて、各ウエルW内のスフェロイドSに対して、先に第1撮像部5により撮像データが取得されたウエルW内のスフェロイドSに対する第2撮像部7による撮像データの取得と、第1撮像部5による別のウエルW内のスフェロイドSの撮像データの取得とが同期されて順に行われる。

【0065】

具体的には、一方のプロセスでは、まず、制御器11により、第2撮像部によるZ方向の観察位置が $Z = 1$ に設定される(ステップSB2)。また、制御器11により、第2撮像部7による観察対象がウエルW($i - N$ 、 j)、すなわちこの場合はウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)に設定される。

30

【0066】

次いで、制御器11により、コンピュータ9によって決定されたウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)のスフェロイドSの中心位置に従って可動ステージ3が駆動され、そのスフェロイドSの中心位置が高倍対物レンズ39の光軸に合わせられる(ステップSB3)。第1撮像部5によりウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)の撮影が行われた直後であるので、ウエルW($i = 1$ 、 $j = 1$)ではなく、最初にウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)のスフェロイドSの中心位置を高倍対物レンズ39の光軸に合わせることににより、可動ステージ3の移動距離を短縮することができる。

40

【0067】

次いで、制御器11により、ポンプ71が駆動されることによって、高倍対物レンズ39の先端レンズとウエルWの底部との間に液体Lが貯留される(ステップSB4)。そして、制御器11により、オートフォーカス装置77が駆動され、高倍対物レンズ39の焦点がウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)の底面Waに合わせられる(ステップSB5)。

【0068】

この状態で、第2撮像部7により、ウエルW($i = 1$ 、 $j = 8$)のスフェロイドSの撮像データが取得される(ステップSB6)。そして、制御器11により、予め設定された例えば $1 \mu\text{m}$ のZステップ間隔で照準部41が駆動され、例えば予め決めてあるステップ

50

数PまでZ位置が変更されながら、ウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSの撮像データが繰り返し取得される(ステップSB6~SB8)。第2撮像部7により取得されたウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSにおけるZ位置が異なる複数の撮像データはコンピュータ9に送られ、コンピュータ9により3次元的なXYZ画像が生成される。
【0069】

このとき、コンピュータ9により、ウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSの球面収差補正值が、Z位置に応じて修正される。そして、制御器11により、Z位置ごとに、修正された球面収差補正值に従って補正環駆動装置61が制御されることによって、補正環59により球面収差が補正される。なお、撮像データを取得するZ方向のステップ数Pは予め決めておいてもよいが、画像処理により蛍光画像が得られなくなった時点で撮像を止めることが望ましい。

10

【0070】

もう一方のプロセスでは、ステップSB3においてウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSの中心位置が高倍対物レンズ39の光軸に合わせられることによって、図6に示すように、ウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) の次にウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) が第1撮像部5の低倍対物レンズ21の光軸上に配置される。

【0071】

そして、第2撮像部7によりウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) の底面Waから略100 μm 上方のZ位置において撮像データが取得されるときに(ステップSB7「YES」)、第1撮像部5により、ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSの撮像データが取得される(ステップSA3')。

20

【0072】

このとき、ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) の中心は低倍対物レンズ21の光軸上にはないが、第1撮像部5の撮像領域はウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) の直径の2倍が確保されているので、第1撮像部5により、ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) 内のスフェロイドSを逃すことなく撮像できる。

【0073】

第1撮像部5により取得された撮像データはコンピュータ9に送られ、コンピュータ9により、ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) のスフェロイドSの中心位置が決定されるとともに、スフェロイドSの直径が計測されることによって球面収差補正值が決定される(ステップSA4')。決定された球面収差補正值は、第2撮像部7によるXYZ画像の取得に利用される。

30

【0074】

続いて、制御器11により、第2撮像部7によるウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) の深さ方向の観察位置、すなわちZ位置がステップ数Pまで変更されたと判断されると(ステップSB8「YES」)、制御器11により、現在の設定が $i =$ 偶数か否かが判断される(ステップSB9)。また、制御器11により、現在の設定が、 $j = n$ か否か(ステップSB10)または $j = 1$ か否か(ステップSB11)が判断される。

【0075】

現在の設定は $i = 2$ 、 $j = 8$ であり、 $i =$ 偶数であるが(ステップSB9「YES」)、 $j = 1$ ではないので(ステップSB11「NO」)、制御器11により、 $j = j - 1$ 、すなわちこの場合は $i = 2$ 、 $j = 7$ に設定が変更されて、ステップSB2に戻る。

40

【0076】

そして、制御器11により可動ステージ3が駆動されることによって、第1撮像部5および第2撮像部7に対してウエルWが移動され、各ウエルWに対して、第2撮像部7によりステップSB2~SB8が繰り返されるとともに、第2撮像部7によりステップSA3'、SA4'が繰り返される。

【0077】

具体的には、第2撮像部7に対しては、図7に示すように、ウエルW ($i = 1$ 、 $j = 8$) からウエルW ($i = 1$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 1$) からウエルW ($i = 2$

50

、 $j = 8$) ウエルW ($i = 3$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 3$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 4$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 4$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 5$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 5$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 6$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 6$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 7$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 7$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 8$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 8$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 9$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 9$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 10$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 10$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 11$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 11$ 、 $j = 1$) まで、各ウエルW内のスフェロイドSの中心位置が高倍対物レンズ39の光軸に順に合わせられて、ステップSB2 ~ SB8が繰り返される。そして、コンピュータ11により、各スフェロイドSの3次元的なXYZ画像が生成される。

10

【0078】

一方、第1撮像部5に対しては、図6に示すように、ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 2$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 3$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 3$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 4$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 4$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 5$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 5$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 6$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 6$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 7$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 7$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 8$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 8$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 9$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 9$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 10$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 10$ 、 $j = 1$) ウエルW ($i = 11$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 11$ 、 $j = 8$) ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 8$) から ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 1$) まで、各ウエルWが低倍対物レンズ21の光軸上に順に移動されて、ステップSA3'、SA4'が繰り返される。

20

【0079】

このとき、制御器11により、第2撮像部7により、ウエルWごとに底面Waから略100 μm 上方のZ位置において撮像データが取得されるときに(ステップSB6)、第1撮像部5により、別のウエルWのスフェロイドSの撮像データが取得される(ステップSA3')。

【0080】

ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 1$) までステップSA3'、SA4'が実施されると、すなわち、設定が $i = 12$ 、 $j = 1$ まで変更されると(ステップSB9「YES」、ステップSB11「YES」、制御器11により、現在の設定が $i = m$ か否かが判断される(ステップSB12)。本実施形態においては $m = 12$ であるから(ステップSB12「YES」、第1撮像部5による撮像データの取得は終了する。

30

【0081】

次に、図5のフローチャートに示されるように、制御器11により、 $i = i + 1$ 、すなわちこの場合は $i = 13$ 、 $j = 1$ に設定される(ステップSB1)。そして、第1撮像部5による撮像データの取得は終了した状態で、第2撮像部7により、ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 8$) まで、ステップSB1 ~ SB10が実施される。

【0082】

ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 8$) までステップSB2 ~ SB10が実施されると、すなわち、設定が $i = 13$ 、 $j = 8$ まで変更されると、 $j = n$ を満たすことから(ステップSB10「YES」、制御器11により、現在の設定が $i = m + N$ か否かが判断される(ステップSB12')。本実施形態においては $m = 12$ 、 $N = 1$ であるから(ステップSB12'「YES」、第2撮像部7による撮像データの取得も終了する。最後に、コンピュータ9により、ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 1$) から ウエルW ($i = 12$ 、 $j = 8$) までの各スフェロイドSの3次元的なXYZ画像が生成されると、撮影は終了する。

40

【0083】

以上説明したように、本実施形態に係る顕微鏡装置1によれば、同一のウエルW内のスフェロイドSに対して、第2撮像部7に先立って、第1撮像部5により撮像データが取得される。これにより、コンピュータ9によって、そのウエルWに収容されているスフェロ

50

イドSの中心位置を容易かつ確実に決定することができる。そして、コンピュータ9によりそのスフェロイドSの中心位置が決定されると、可動ステージ3によりそのスフェロイドSの中心位置が高倍対物レンズ39の光軸に合わせられた状態で、第2撮像部7により撮像データが取得される。これにより、第2撮像部7によって、スフェロイドSが十分に写っていない無駄な撮像データを抑制することができ、スフェロイドSの高解像の撮像データを効率的に取得することができる。

【0084】

この場合において、制御器11が、第2撮像部7による撮像データの取得に同期して、第1撮像部5により別のウエルW内のスフェロイドSの撮像データを取得させることによって、第1撮像部5により全てのスフェロイドSの撮像データを取得してから第2撮像部7により全てのスフェロイドSに対して撮像データを取得していく場合と比較して、第1撮像部5による撮像データの取得と第2撮像部7による撮像データの取得とが時間的に重複されて行われる分だけ、スループットを向上することができる。これにより、複数のスフェロイドSの高解像の撮像データを高スループットで取得することができる。

10

【0085】

本実施形態においては、コンピュータ9および制御器11が像倍率調整部として機能することとしてもよい。すなわち、コンピュータ9が、第1撮像部5により取得されたスフェロイドSの撮像データからスフェロイドSのXY平面内での大きさ情報を取得し、制御器11が、この大きさ情報に基づいて、XYガルバノミラースキャナ47によるレーザ光の走査域を変更することにより、第2撮像部7の像倍率を調整することとしてもよい。

20

【0086】

これにより、光学分解能に対して、撮像画素数と撮像領域とにより決定される画素ピッチ上の分解能を向上することができる。さらに、第2撮像部7の像倍率が決定されたときに撮像画素数を変更することによって、撮像画素数と撮像領域とにより決定される画素ピッチ上の分解能を最適化することができる。

【0087】

また、本実施形態においては、低倍対物レンズ21の光軸を高倍対物レンズ39の光軸上に略合わせる移動手段を設けることとしてもよい。移動手段により反射照明装置33と第1撮像部5とを移動させることによって、第2撮像部7に対する透過照明装置を構成することができる。これにより、高倍対物レンズ39を用いた高倍率の透過照明観察を行うことができる。

30

【0088】

〔第2実施形態〕

次に、本発明の第2実施形態に係る顕微鏡装置（顕微鏡）について説明する。

本実施形態に係る顕微鏡装置81は、図8に示すように、第1撮像部5に代えて、可動ステージ3により支持されるマイクロプレート13の下方に配置される第1撮像部83を備え、第2撮像部7に代えて、多光子励起顕微鏡を構成する第2撮像部85を備える点で第1実施形態と異なる。

以下、第1実施形態に係る顕微鏡装置1と構成を共通する箇所には、同一符号を付して説明を省略する。

40

【0089】

本実施形態においては、ウエルWが斜面Wbを有さず、底面Waが直径約6mmの大きさを有している。各ウエルWには、それぞれ複数個のスフェロイドSが培養液Cとともに収容されている。

【0090】

第1撮像部83は、鉛直上方に向けて配置された1倍の倍率を有する低倍対物レンズ（第1対物レンズ）87と、照準部23と、反射ミラー25と、結像レンズ29と、カメラ31とを備えている。照準部23は、低倍対物レンズ87をZ方向に移動させることによって、ウエルWの底面Waから略100 μ mのZ位置に焦点を合わせる。

【0091】

50

本実施形態において、カメラ 31 は、低倍対物レンズ 87 および結像レンズ 29 との組み合わせにより、約 1.3×1.3 mm の撮像領域を確保することができる。したがって、ウエル W の底面 Wa の最外縁部を低倍対物レンズ 87 の光軸上に合わせたとしても、ウエル W の全領域を撮影することができる。

【0092】

本実施形態においては、反射照明装置 33 に代えて、スフェロイド S に照明光を照射することによって、第 1 撮像部 83 に向けて低倍対物レンズ 87 の光軸に沿って照明光をスフェロイド S に透過させる透過照明装置 89 を備えている。

【0093】

透過照明装置 89 は、ハロゲンランプ 35 と、集光レンズ 37 と、集光レンズ 37 により集光された照明光を平行光に変換するコンデンサレンズ 91 と、偏射照明用の絞り 93 とを備えている。この透過照明装置 89 は、低倍対物レンズ 87 の光軸に対して角度をつけてスフェロイド S に照明光を照射することによって、スフェロイド S を偏射照明する。

10

【0094】

これら透過照明装置 89 および第 1 撮像部 83 においては、ハロゲンランプ 35 から発せられた照明光は、集光レンズ 37 により集光された後、絞り 93 により光路を制限される。そして、絞り 93 を通過した照明光が、コンデンサレンズ 91 により平行光に変換されて、ウエル W 内のスフェロイド S に対して上方から角度をつけて照射される。照明光が照射されることによりスフェロイド S を透過した透過光は、低倍対物レンズ 87 により集光されて、反射ミラー 25 により反射された後、結像レンズ 29 により集光されてカメラ 31 により撮影される。

20

【0095】

第 2 撮像部 85 は、高倍対物レンズ 39 と、結像レンズ 43 と、瞳投影レンズ 45 と、XY ガルバノミラー スキャナ 47 と、超短パルス赤外レーザ光を発生する超短パルス赤外レーザ 95 と、超短パルス赤外レーザ 95 から発せられた超短パルス赤外レーザ光を透過させる一方、スフェロイド S から発せられる蛍光を反射するダイクロイックミラー 97 と、ダイクロイックミラー 97 により反射された蛍光を集光する集光レンズ 99 と、光検出器 57 とを備えている。

【0096】

また、第 2 撮像部 85 には、ダイクロイックミラー 79 に代えて、オートフォーカス装置 77 から射出する赤外レーザ光のみを反射する一方、その他の波長の光を透過させるノッチ型ダイクロイックミラー 100 が備えられている。ノッチ型ダイクロイックミラー 100 は、高倍対物レンズ 39 の光軸上であって、高倍対物レンズ 39 と結像レンズ 43 との間に配置されている。

30

【0097】

この第 2 撮像部 85 においては、超短パルス赤外レーザ 95 から発せられた超短パルス赤外レーザ光は、XY ガルバノミラー スキャナ 47 により 2 次元的に走査された後、瞳投影レンズ 45、ダイクロイックミラー 97、結像レンズ 43 およびノッチ型ダイクロイックミラー 100 を透過して、高倍対物レンズ 39 によりウエル W 内のスフェロイド S に対して鉛直下方から照射される。超短パルス赤外レーザ光が照射されることによりスフェロイド S において発生した蛍光は、高倍対物レンズ 39 により集光されてレーザ光の光路を戻り、ノッチ型ダイクロイックミラー 100 および結像レンズ 43 を透過してダイクロイックミラー 97 により反射された後、集光レンズ 99 により集光されて光検出器 57 により検出される。

40

【0098】

上述した第 1 撮像部 83 の低倍対物レンズ 87 の光軸と第 2 撮像部 85 の高倍対物レンズ 39 の光軸は、マイクロプレート 13 のウエルピッチ 3 つ分 ($N = 3$) だけ離れて配置される。より具体的には、低倍対物レンズ 87 の光軸と高倍対物レンズ 39 の光軸は、互いに X 方向にウエル W 3 つ分だけ距離をあけて配置される。

【0099】

50

上記構成の顕微鏡装置 8 1 の作用について、図 3 ~ 図 5 のフローチャートを参照して説明する。本実施形態において採用するマイクロプレート 1 3 は、ウエル数が $12 \times 8 = 96$ 個 ($i = 1 \sim 12$ 、 $j = 1 \sim 8$) であるので、 $m = 12$ 、 $n = 8$ である。また、低倍対物レンズ 2 1 の光軸と高倍対物レンズ 3 9 の光軸の間隔 (N) は $N = 3$ である。

【0100】

本実施形態に係る顕微鏡装置 8 1 によりマイクロプレート 1 3 の各ウエル W に収容されているスフェロイド S を観察するには、図 3 のフローチャートに示されるように、まず、第 1 撮像部 8 3 により先読みする。

【0101】

具体的には、まず、制御器 1 1 により、 $i = 1$ 、 $j = 1$ が設定される (ステップ $SA 1$)。そして、制御器 1 1 により可動ステージ 3 が駆動されることによって、図 6 に示すように、ウエル $W (i = 1, j = 1)$ からウエル $W (i = 1, j = 8)$ ウエル $W (i = 2, j = 8)$ からウエル $W (i = 2, j = 1)$ ウエル $W (i = 3, j = 1)$ からウエル $W (i = 3, j = 8)$ まで、各ウエル W の中心位置が第 1 撮像部 8 3 の低倍対物レンズ 8 7 の光軸上に順に移動されて、ステップ $SA 2 \sim SA 7$ が実施される。

【0102】

ウエル $W (i = 3, j = 8)$ までステップ $SA 2 \sim SA 7$ が実施されると、すなわち、設定が $i = 3$ 、 $j = 8$ まで変更されると、 $j = n$ を満たすことから (ステップ $SA 6$ 「YES」)、制御器 1 1 により、現在の設定が $i = N$ か否かが判断される (ステップ $SA 8$)。本実施形態においては低倍対物レンズ 2 1 の光軸と高倍対物レンズ 3 9 の光軸の間隔 (N) が $N = 3$ であるから (ステップ $SA 8$ 「YES」)、先読みは終了する。

【0103】

次に、図 4 に示すフローチャートに示されるように、制御器 1 1 により、 $i = i + 1$ 、すなわちこの場合は $i = 4$ 、 $j = 8$ に設定される (ステップ $SB 1$)。そして、制御器 1 1 により可動ステージ 3 が駆動されることによって、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 に対してウエル W が移動され、各ウエル W に対して、第 2 撮像部 7 によりステップ $SB 2 \sim SB 8$ が繰り返されるとともに、第 1 撮像部 5 によりステップ $SA 3'$ 、 $SA 4'$ が繰り返される。

【0104】

具体的には、一方のプロセスでは、第 2 撮像部 8 5 に対して、図 7 に示すように、ウエル $W (i = 1, j = 8)$ からウエル $W (i = 1, j = 1)$ ウエル $W (i = 2, j = 1)$ からウエル $W (i = 2, j = 8)$ ウエル $W (i = 3, j = 8)$ からウエル $W (i = 3, j = 1)$ ウエル $W (i = 4, j = 1)$ からウエル $W (i = 4, j = 8)$ ウエル $W (i = 5, j = 8)$ からウエル $W (i = 5, j = 1)$ ウエル $W (i = 6, j = 1)$ からウエル $W (i = 6, j = 8)$ ウエル $W (i = 7, j = 8)$ からウエル $W (i = 7, j = 1)$ ウエル $W (i = 8, j = 1)$ からウエル $W (i = 8, j = 8)$ ウエル $W (i = 9, j = 8)$ からウエル $W (i = 9, j = 1)$ まで、ウエル W 内のスフェロイド S の中心位置が高倍対物レンズ 3 9 の光軸に順に合わせられて、ステップ $SB 2 \sim SB 8$ が繰り返される。そして、コンピュータ 9 により、スフェロイド S ごとに 3 次元的な XYZ 画像が生成される。

【0105】

もう一方のプロセスでは、第 1 撮像部 8 3 に対して、図 6 に示すように、ウエル $W (i = 4, j = 8)$ からウエル $W (i = 4, j = 1)$ ウエル $W (i = 5, j = 1)$ からウエル $W (i = 5, j = 8)$ ウエル $W (i = 6, j = 8)$ からウエル $W (i = 6, j = 1)$ ウエル $W (i = 7, j = 1)$ からウエル $W (i = 7, j = 8)$ ウエル $W (i = 8, j = 8)$ からウエル $W (i = 8, j = 1)$ ウエル $W (i = 9, j = 1)$ からウエル $W (i = 9, j = 8)$ ウエル $W (i = 10, j = 8)$ からウエル $W (i = 10, j = 1)$ ウエル $W (i = 11, j = 1)$ からウエル $W (i = 11, j = 8)$ ウエル $W (i = 12, j = 8)$ からウエル $W (i = 12, j = 1)$ まで、各ウエル W が低倍対物レンズ 8 7 の光軸上に順に移動されて、ステップ $SA 3'$ 、 $SA 4'$ が繰り返される。

10

20

30

40

50

【0106】

このとき、上記2つのプロセスにおいて、制御器11により、各ウエルW内のスフェロイドSに対する第2撮像部7による撮像データの取得(ステップSB6)と、第1撮像部5による別のウエルW内のスフェロイドSに対する撮像データの取得(ステップSA3')とが同期される。

【0107】

ウエルW($i = 12$ 、 $j = 1$)までステップSA3'、SA4'が実施されると、すなわち、設定が $i = 12$ 、 $j = 1$ まで変更されると(ステップSB9「YES」、ステップSB11「YES」、制御器11により、現在の設定が $i = m$ か否かが判断される(ステップSB12)。本実施形態においては $m = 12$ であるから(ステップSB12「YES」)、第1撮像部5による撮像データの取得は終了する。

10

【0108】

次に、図5のフローチャートに示されるように、制御器11により、 $i = i + 1$ 、すなわちこの場合は $i = 13$ 、 $j = 1$ に設定される(ステップSB1)。そして、第1撮像部83による撮像データの取得は終了した状態で、第2撮像部85により、ウエルW($i = 10$ 、 $j = 1$)からウエルW($i = 10$ 、 $j = 8$) ウエルW($i = 11$ 、 $j = 8$)からウエルW($i = 11$ 、 $j = 1$) ウエルW($i = 12$ 、 $j = 1$)からウエルW($i = 12$ 、 $j = 8$)まで、ステップSB1~SB11が実施される。

【0109】

ウエルW($i = 12$ 、 $j = 8$)までステップSB2~SB11が実施されると、すなわち、設定が $i = 15$ 、 $j = 8$ まで変更されると、 $j = n$ を満たすことから(ステップSB10「YES」、制御器11により、現在の設定が $i = m + N$ か否かが判断される(ステップSB12')。本実施形態においては $m = 12$ 、 $N = 3$ であるから(ステップSB12'「YES」)、第2撮像部7による撮像データの取得も終了する。最後に、コンピュータ9により、スフェロイドSごとに3次元的なXYZ画像が生成されて、撮影は終了する。

20

【0110】

以上説明したように、本実施形態に係る顕微鏡装置81によっても、制御器11が、第2撮像部85による撮像データの取得に同期して、第1撮像部83により別のウエルW内のスフェロイドSの撮像データを取得させることによって、第1実施形態と同様の効果が期待できる。また、本実施形態においては、各ウエルWに収容されている複数のスフェロイドSをそれぞれウエルWに対応付けて、各スフェロイドSの中心位置と球面収差補正值を決定し、第2撮像部85による撮像データの取得に利用することができる。

30

【0111】

また、本実施形態においては、第1撮像部83が倒立型によって構成され、偏射照明が可能な透過照明装置89が低倍対物レンズ87の光軸上に付加される。この構成により、第1撮像部83において、コントラストの高い良好な撮像データを取得することができる。また、第2撮像部85が、多光子励起顕微鏡で構成されていることによって、透明化処理がなされていない比較的大きなスフェロイドSに対しても良好な撮像データを取得することができるという利点がある。

40

【0112】

〔第3実施形態〕

次に、本発明の第3実施形態に係る顕微鏡装置(顕微鏡)について説明する。

本実施形態に係る顕微鏡装置101は、図9に示すように、低倍対物レンズ21の光軸と高倍対物レンズ39の光軸とが同軸上に配置されており、第1撮像部5が、少なくとも $R = (\text{ウエルピッチ} + \text{ウエル直径})$ を半径とする領域を撮像可能な撮像領域を有している点で第1実施形態と異なる。図9において、図示していないが、顕微鏡装置101は、第1実施形態と同様に、反射照明装置33およびカメラ31を備えている。

以下、第1実施形態に係る顕微鏡装置1と構成を共通する箇所には、同一符号を付して説明を省略する。

50

【 0 1 1 3 】

本実施形態においては、制御器 1 1 により可動ステージ 3 が駆動されることによって、図 1 0 に示すように、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 に対して、ウエル W ($i = 1$ 、 $j = 1$) からウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 1$) ウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 2$) からウエル W ($i = 1$ 、 $j = 2$) ウエル W ($i = 1$ 、 $j = 3$) からウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 3$) ウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 4$) からウエル W ($i = 1$ 、 $j = 4$) ウエル W ($i = 1$ 、 $j = 5$) からウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 5$) ウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 6$) からウエル W ($i = 1$ 、 $j = 6$) ウエル W ($i = 1$ 、 $j = 7$) からウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 7$) ウエル W ($i = 1 2$ 、 $j = 8$) からウエル W ($i = 1$ 、 $j = 8$) の順に移動される。

【 0 1 1 4 】

最初に、第 1 撮像部 5 により、ウエル W ($i = 1$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データが取得される。図 1 0 において、大円は第 1 撮像部 5 の撮像領域を概念的に表している。

【 0 1 1 5 】

次いで、制御器 1 1 により、第 1 撮像部 5 により取得されたウエル W ($i = 1$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データに基づいてコンピュータ 9 により決定されるそのスフェロイド S の中心位置に従って可動ステージ 3 が駆動され、そのスフェロイド S の中心位置が第 2 撮像部 7 の高倍対物レンズ 3 9 の光軸に合わせられる。

【 0 1 1 6 】

そして、第 2 撮像部 7 によるウエル W ($i = 1$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データの取得と同期して、第 1 撮像部 5 によりウエル W ($i = 2$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データが取得される。

【 0 1 1 7 】

次いで、制御器 1 1 により、第 1 撮像部 5 により取得されたウエル W ($i = 2$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データに基づいてコンピュータ 9 により決定されるそのスフェロイド S の中心位置に従って可動ステージ 3 が駆動され、そのスフェロイド S の中心位置が第 2 撮像部 7 の高倍対物レンズ 3 9 の光軸に合わせられる。

【 0 1 1 8 】

そして、第 2 撮像部 7 によるウエル W ($i = 2$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データの取得と同期して、第 1 撮像部 5 によりウエル W ($i = 3$ 、 $j = 1$) のスフェロイド S の撮像データが取得される。

【 0 1 1 9 】

同様にして、図 1 0 に示す矢印に従って、第 1 撮像部 5 および第 2 撮像部 7 に対してウエル W が移動されながら、先に第 1 撮像部 5 により撮像データが取得されたウエル W 内のスフェロイド S に対する第 2 撮像部 7 による撮像データの取得と、第 1 撮像部 5 による別のウエル W 内のスフェロイド S の撮像データの取得とが同期して順に行われる。

【 0 1 2 0 】

最後に、第 1 撮像部 5 により取得されたウエル W ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイド S の撮像データに基づいてコンピュータ 9 により決定されるそのスフェロイド S の中心位置に従って可動ステージ 3 が駆動され、そのスフェロイド S の中心位置が第 2 撮像部 7 の高倍対物レンズ 3 9 の光軸に合わせられる。

【 0 1 2 1 】

そして、第 1 撮像部 5 による撮像データの取得は終了した状態で、第 2 撮像部 7 によりウエル W ($i = 1$ 、 $j = 8$) のスフェロイド S の撮像データが取得され、コンピュータ 9 によりそのスフェロイド S の X Y Z 画像が生成されると、撮影は終了する。

【 0 1 2 2 】

以上説明したように、本実施形態に係る顕微鏡装置によっても、制御器 1 1 が、第 2 撮像部 7 による撮像データの取得に同期して、第 1 撮像部 5 により別のウエル W 内のスフェロイド S の撮像データを取得させることによって、第 1 実施形態と同様の効果がある。特に、本実施形態においては、9 6 個のウエル W の内、9 4 個のウエル W に対して、第 1 撮

10

20

30

40

50

像部 5 と第 2 撮像部 7 とが同期してスフェロイド S の撮像データを取得するので、非常に高いスループットを達成することができる。

【 0 1 2 3 】

上記第 1、第 2 実施形態においては、例えば、ウエル数が 1 5 3 6 個 ($i = 1 \sim 48$ 、 $j = 1 \sim 32$) で、ウエルピッチが 2.25 mm のマイクロプレートを基準として、低倍対物レンズ 21 の光軸と高倍対物レンズ 39 の光軸とを互いに 4.5 mm、9 mm または 18 mm 離して配置することとしてもよい。

【 0 1 2 4 】

こうすることによって、ウエル数が 384 個 ($i = 1 \sim 24$ 、 $j = 1 \sim 16$) で、ウエルピッチが 4.5 mm のマイクロプレート、ウエル数が 96 個 ($i = 1 \sim 12$ 、 $j = 1 \sim 8$) で、ウエルピッチが 9 mm のマイクロプレート 13、および、ウエル数が 24 個 ($i = 1 \sim 6$ 、 $j = 1 \sim 4$) で、ウエルピッチが 18 mm のマイクロプレートのいずれにも対応することができる。

10

【 0 1 2 5 】

また、上記各実施形態においては、複数のウエル W が方形状に配列されているマイクロプレート 13 を例示して説明したが、これに代えて、複数のウエル W が周方向に間隔をあけて円環状に配列されているマイクロプレートを採用することとしてもよい。この場合、マイクロプレートを回転させる回転ステージ採用し、可動ステージ 3 が、この回転ステージを X 方向および Y 方向に移動させることとすればよい。

【 0 1 2 6 】

複数のウエル W が 1 列の円環状に配列されたマイクロプレートに対しては、低倍対物レンズ 21、87 と高倍対物レンズ 39 とを周方向にウエルピッチの整数倍 (N) の間隔をあけて配置することとすればよい。

20

【 0 1 2 7 】

複数のウエル W が径方向に位置をずらした複数列の円環状に配列されたマイクロプレートに対しては、低倍対物レンズ 21、87 と高倍対物レンズ 39 とを周方向に間隔をあけて配置するとともに、移動手段を設けることによって、撮像データを取得するウエル W の列を変更する場合に第 1 撮像部 5 の位置を調整することとすればよい。

【 0 1 2 8 】

また、低倍対物レンズ 21、87 と高倍対物レンズ 39 は、径方向にウエルピッチの整数倍 (N) の間隔をあけて配置することとしてもよい。ウエルピッチが回転角度で決められている場合は、低倍対物レンズ 21、87 および高倍対物レンズ 39 に対して、ウエル W の列に関わらず同じ回転角度でマイクロプレートを回転させることとすればよい。また、ウエルピッチが距離で決められている場合は、低倍対物レンズ 21、87 および高倍対物レンズ 39 に対して、ウエル W の列によってマイクロプレートの回転角度を変更することとすればよい。

30

【 0 1 2 9 】

また、上記各実施形態においては、96 個のウエル W を有する一般的なマイクロプレート 13 を例示して説明したが、サンプル容器としては、一般的なマイクロプレートのウエルに限らない。例えば、ハンギングドロップを形成する支持体がアレイ配列されてなる基材に対しても適用することができる。

40

【 0 1 3 0 】

以上、本発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。例えば、本発明を上記各実施形態および変形例に適用したものに限定されることなく、これらの実施形態および変形例を適宜組み合わせた実施形態に適用してもよく、特に限定されるものではない。

【 0 1 3 1 】

また、例えば、上記各実施形態においては、低倍対物レンズ 21、87 および高倍対物レンズ 39 を例示して説明したが、第 2 撮像部 7 が、第 1 撮像部 5 が有する第 1 対物レン

50

ズよりも倍率が高い第2対物レンズを有することとすればよく、これらに限定されるものではない。また、第1撮像部5、83および第2撮像部7、85の撮像領域も、上記各実施形態において例示した大きさに限定されるものではない。

【0132】

また、サンプルの代表位置として、スフェロイドSの中心位置を例示して説明したが、スフェロイドSにおいて基準となる位置であればよい。また、サンプルとして、スフェロイドSを例示して説明したが、これに代えて、例えば、細胞、細胞組織またはオルガノイド等からなる生物由来材料等を採用してもよい。

【符号の説明】

【0133】

1、81、101	顕微鏡装置（顕微鏡）	
3	可動ステージ	
5、83	第1撮像部	
7、85	第2撮像部	
9	コンピュータ（代表位置決定部、補正值決定部、像倍率調整部）	
11	制御器（制御部、像倍率調整部）	
21、87	低倍対物レンズ（第1対物レンズ）	
33	反射照明装置	
39	高倍対物レンズ（第2対物レンズ）	
47	X Y ガスバノミラースキャナ（走査部、像倍率調整部）	20
57	光検出器（撮像画素数変更手段）	
59	補正環（球面収差補正部）	
89	透過照明装置	
S	スフェロイド（サンプル）	

10

20

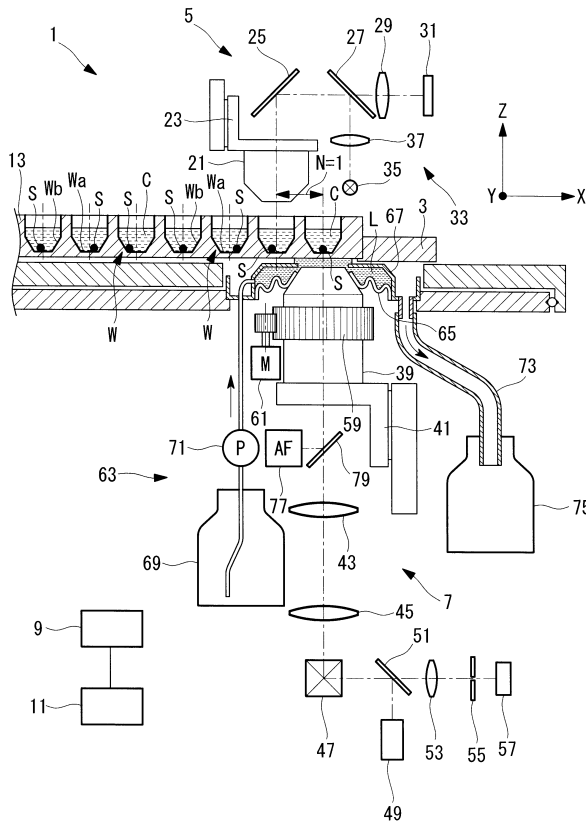
30

40

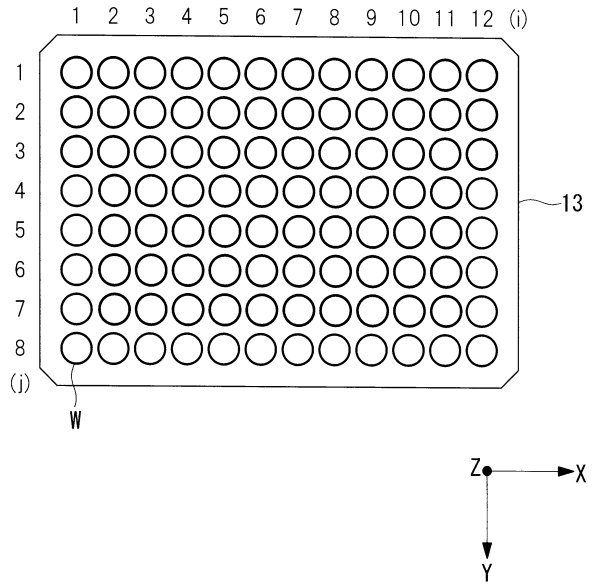
50

【図面】

【図 1】



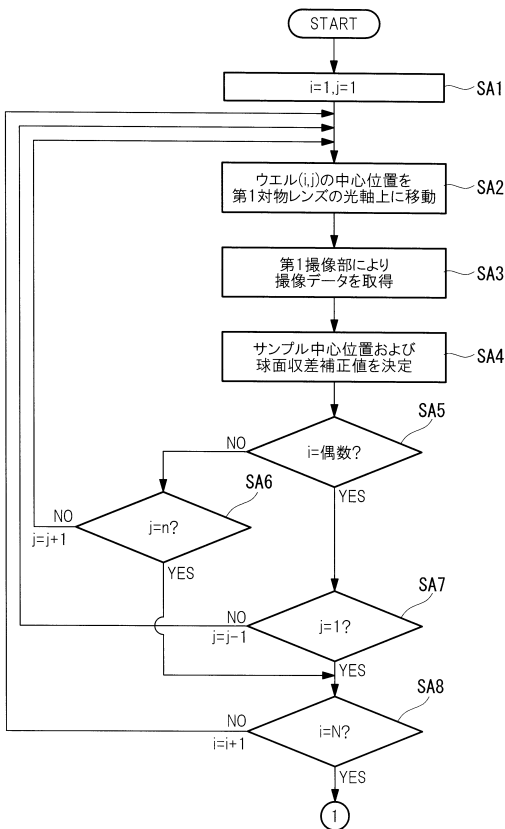
【図 2】



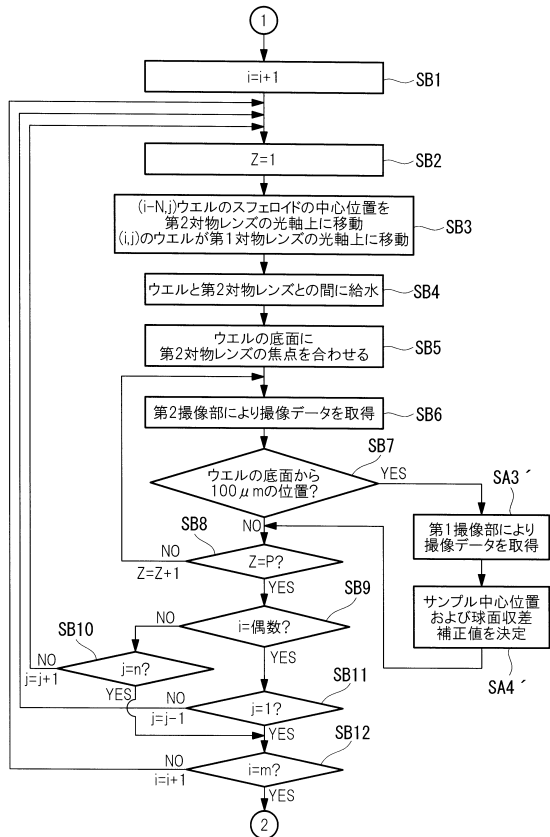
10

20

【図 3】



【図 4】

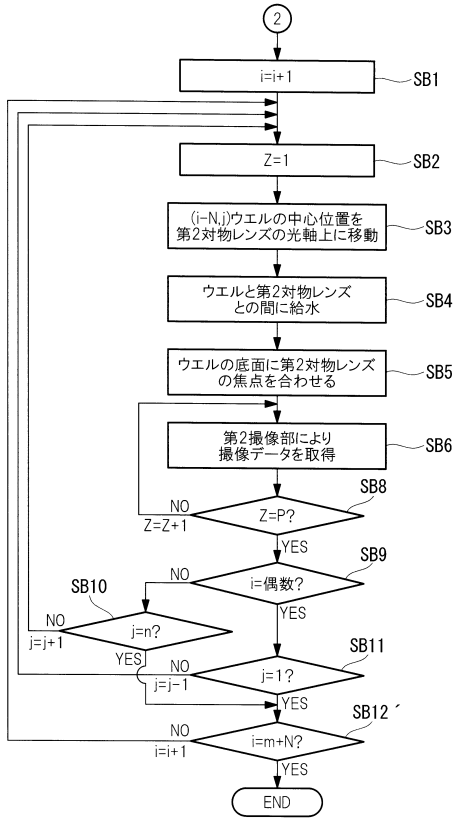


30

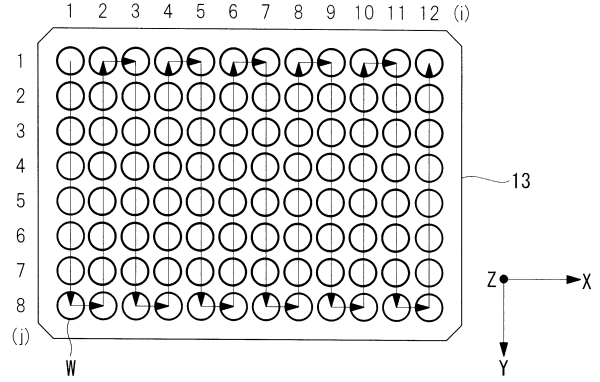
40

50

【 図 5 】



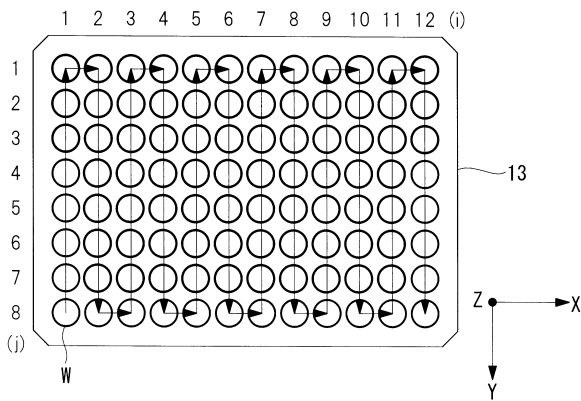
【 図 6 】



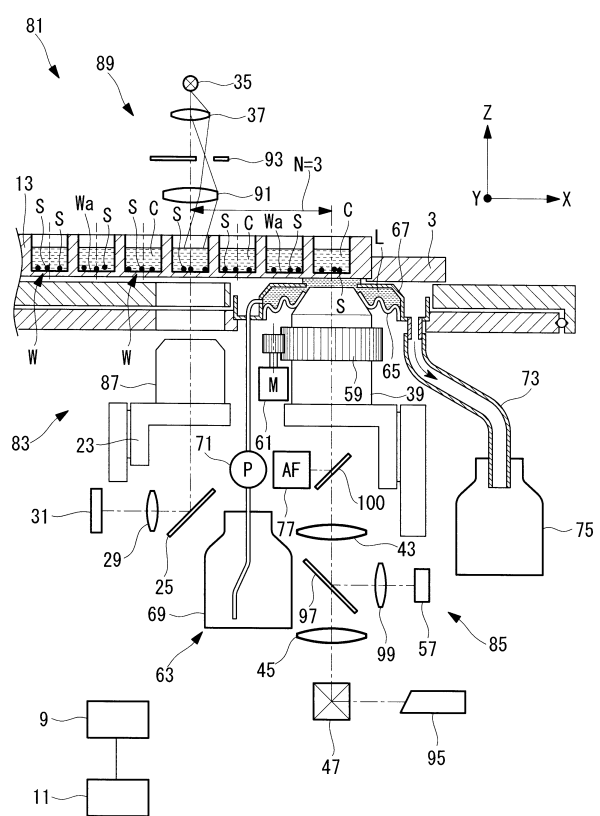
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

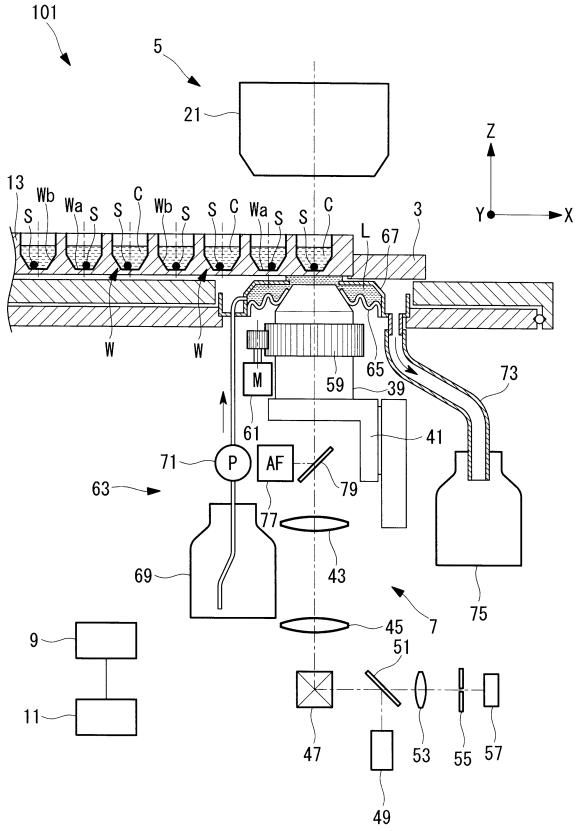


30

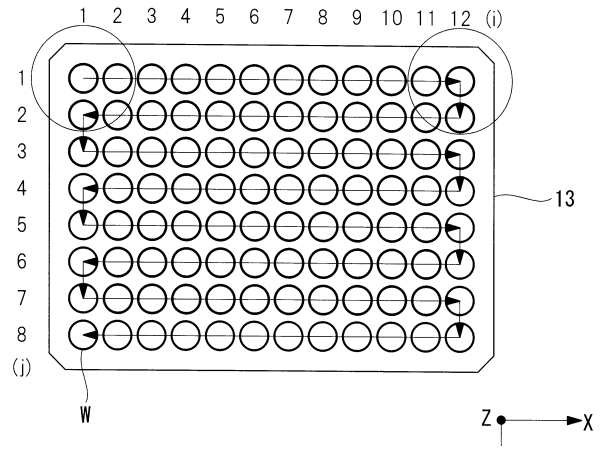
40

50

【図 9】



【図 10】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2017/165343(WO, A2)
特開2017-207567(JP, A)
特開2007-205973(JP, A)
特開2003-015056(JP, A)
国際公開第2012/029817(WO, A1)
特開2006-098286(JP, A)
中国特許出願公開第103955050(CN, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
G02B 21/00 - 21/36
G01N 21/00 - 21/74
C12M 1/00 - 3/10