

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4454998号  
(P4454998)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34 B
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02

請求項の数 10 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2003-337859 (P2003-337859)	(73) 特許権者	000004112 株式会社ニコン 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号
(22) 出願日	平成15年9月29日(2003.9.29)	(73) 特許権者	501168629 今泉 祐治 愛知県名古屋市瑞穂区下山町1丁目75番地の4
(65) 公開番号	特開2005-102538 (P2005-102538A)	(74) 代理人	100072718 弁理士 古谷 史旺
(43) 公開日	平成17年4月21日(2005.4.21)	(72) 発明者	中野 義太郎 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内
審査請求日	平成18年8月30日(2006.8.30)	(72) 発明者	佐瀬 一郎 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞観察装置および細胞観察方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む画像取込手段と、

前記画像取込手段で前記標本の画像を取り込んだ後、前記標本に所定の刺激を与える刺激手段と、

取り込んだ前記標本の画像を基に、前記刺激手段による刺激を与える前の前記各細胞の細胞周期の中の所定の時期を特定し、前記所定の時期から前記刺激手段が前記刺激を与える時期までの前記各細胞に基づいて、前記各細胞の初期状態を認定する認定手段と、

前記刺激手段による前記標本への刺激を与えた後に前記画像取込手段により前記標本の画像を取り込み、刺激が与えられた後の前記標本の画像に基づいて、前記刺激に対する前記標本の反応を検出する検出手段と、

刺激を与える前に取り込んだ前記標本の画像と刺激が与えられた後に取り込んだ各初期状態が異なる複数の細胞を含む前記画像から、細胞の初期状態と刺激による反応との関連情報を生成する生成手段とを備えた

ことを特徴とする細胞観察装置。

【請求項2】

請求項1に記載の細胞観察装置において、

前記認定手段は、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した変化に基づき特定し、特定された各細胞毎の前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激手段が

10

20

前記刺激を与える時期までの経過時間を算出し、該算出結果に基づき前記各細胞毎に前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激手段が前記刺激を与える時期までの経過時間に相当する各細胞の初期状態を認定する

ことを特徴とする細胞観察装置。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の細胞観察装置において、

前記認定手段は、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した前記標本からの蛍光に基づく情報の変化に基づき特定し、前記刺激手段による刺激を与えるまでの前記標本からの蛍光に基づく情報の変化から、各細胞の初期状態を認定する

ことを特徴とする細胞観察装置。

10

【請求項 4】

請求項 2 に記載の細胞観察装置において、

前記認定手段は、前記刺激手段が前記刺激を与える前に前記画像取込手段が順に取り込んだ複数の前記画像を参照し、前記複数の細胞の各々の変化に基づいて、前記複数の細胞の各々の初期状態を認定する

ことを特徴とする細胞観察装置。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の細胞観察装置において、

前記認定手段は、前記複数の細胞の各々の前記細胞周期の位相ずれを前記初期状態として認定する

ことを特徴とする細胞観察装置。

20

【請求項 6】

個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程と、

前記標本の画像を取り込んだ後、前記標本に所定の刺激を与える工程と、

取り込んだ前記標本の画像を基に、刺激を与える前の前記各細胞の細胞周期の中の所定の時期を特定し、前記所定の時期から前記刺激を与える時期までの前記各細胞に基づいて、前記各細胞の初期状態を認定する工程と、

前記標本に刺激を与えた後に前記標本の画像を取り込み、刺激が与えられた後の前記標本の画像に基づいて、前記刺激に対する前記標本の反応を検出する工程と、

刺激を与える前に取り込んだ前記標本の画像と刺激が与えられた後に取り込んだ各初期状態が異なる複数の細胞を含む前記画像から、細胞の初期状態と刺激による反応との関連情報を生成する工程とを備えた

ことを特徴とする細胞観察方法。

30

【請求項 7】

請求項 6 に記載の細胞観察方法において、

前記各細胞の初期状態を認定する工程では、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した変化に基づき特定し、特定された各細胞毎の前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激を与える時期までの経過時間を算出し、該算出結果に基づき前記各細胞毎に前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激を与える時期までの経過時間に相当する各細胞の初期状態を認定する

ことを特徴とする細胞観察方法。

40

【請求項 8】

請求項 6 に記載の細胞観察方法において、

前記各細胞の初期状態を認定する工程では、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した前記標本からの蛍光に基づく情報の変化に基づき特定し、刺激を与えるまでの前記標本からの蛍光に基づく情報の変化から、各細胞の初期状態を認定する

ことを特徴とする細胞観察方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の細胞観察方法において、

50

前記個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程では、複数の前記画像を順に取り込むことを特徴とする細胞観察方法。

【請求項10】

請求項7に記載の細胞観察方法において、

前記個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程では、前記複数の細胞の各々の前記細胞周期の位相ずれを前記初期状態として認定する

ことを特徴とする細胞観察方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の反応を観察する細胞観察装置および細胞観察方法に関し、特に、医薬品の開発過程におけるスクリーニングに好適な細胞観察装置などに関する。

【背景技術】

【0002】

周知の同調培養法（例えば非特許文献1参照）を用いて多数の細胞を培養することにより、これら多数の細胞の状態（例えば細胞周期の分裂期のタイミング）を均一化して、薬物を導入するなどの刺激を与え、細胞の反応を観察することが行われている。この方法によれば、多数の細胞の平均的な反応を観察できる。

20

【非特許文献1】Weimer R, Haaf T, Kruger J, Poot M, Schmid M. 「Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0,G1,S,G2,G1,and early S' phase in human lymphocytes.」 Human Genetics 88:673-682(1992)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、上記した同調培養法は、その作業が非常に煩雑であった。また、多数の細胞の初期状態（例えば刺激を与える直前の状態）と反応との相関関係を調べようとすると、細胞の初期状態が異なる多種類の標本を同調培養法により用意しなければならず、膨大な労力と時間が必要となってしまう。

30

ここで、本発明者らが行った実験について説明する。この実験は、従来の手法を組み合わせさせて多数の細胞の初期状態と反応との相関関係を調べたものである。まず、同調培養法により、多種類の標本を用意する。つまり、対数増幅期にある細胞懸濁液を濃度が  $5 \times 10^5$  cells/ml となるように調整し、最終濃度（細胞の種類によって異なる）が  $0.5 \sim 2.5$  mM となるようにチミジン液を加え、 $CO_2$  インキュベータ内で  $16 \sim 24$  時間培養する。この操作により、標本内の多数の細胞は、細胞周期のギャップ期(G1期)/DNA合成期(S期)の境界とS期に同調する。次に、細胞培養上清（上澄み）を遠心分離によって除き、培養液に戻して  $15$  時間培養する。この操作により、標本内の多数の細胞は、ギャップ期(G2期)/分裂期(M期)の境界に進行する。さらに、最終濃度が  $0.5 \sim 2.5$  mM となるようにチミジン液を加え、 $CO_2$  インキュベータ内で  $16 \sim 24$  時間培養する。この操作により、標本内の多数の細胞は、G1期/S期の境界に同調する。なお、標本内の多数の細胞が細胞周期の何れの時期に同調したかの確認は、細胞を propidium iodide(PI)染色した後、周知のFlow Cytometry 法を用いて、細胞ごとのDNA量を測定することにより行えばよい。本発明者らは、上記のようにして、細胞の初期状態（ここでは細胞周期の中の時期）が異なる多種類の標本を用意した。

40

【0004】

そして、多種類の標本の各々において、細胞表面のイオンチャネルの発現量を測定した。イオンチャネルは、カルシウム活性化カリウムチャネルのうち、小コンダクタンス(SK)のタイプ2である。測定は、抗SK2チャネル抗体を用いた周知のWestern blot 法により行った。測定結果を図4に示す。図4の横軸は時間(time)であり、細胞周期のG

50

1期の開始時間を0として、S期とG2期/M期の各々の時間が分かるようになっている。図4の縦軸は、イオンチャネルの発現量を相対的な分布密度(relative density)で表したものである。この測定結果から、イオンチャネルの発現量は、細胞周期の中の時期によって増減することが判明した。一般に、イオンチャネルの発現量と細胞の反応(この場合は細胞膜電位変化)は相関しているため、上記の測定結果は、細胞の反応が細胞周期の中の時期によって変化することを意味している。具体的には、SK2チャネルの場合、G1期では反応性が高く、S期とG2期/M期では反応性が低くなる。

#### 【0005】

このように、従来の手法を用いて細胞の初期状態と反応との相関関係(例えば図4)を調べるためには、細胞の初期状態が異なる多種類の標本を同調培養法により用意しなければならず、膨大な労力と時間が必要であった。

本発明の目的は、同調培養法を用いることなく簡単に細胞の初期状態と反応との相関関係を調べることができる細胞観察装置および細胞観察方法を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明の細胞観察装置は、個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む画像取込手段と、前記画像取込手段で前記標本の画像を取り込んだ後、前記標本に所定の刺激を与える刺激手段と、取り込んだ前記標本の画像を基に、前記刺激手段による刺激を与える前の前記各細胞の細胞周期の中の所定の時期を特定し、前記所定の時期から前記刺激手段が前記刺激を与える時期までの前記各細胞に基づいて、前記各細胞の初期状態を認定する認定手段と、前記刺激手段による前記標本への刺激を与えた後に前記画像取込手段により前記標本の画像を取り込み、刺激が与えられた後の前記標本の画像に基づいて、前記刺激に対する前記標本の反応を検出する検出手段と、刺激を与える前に取り込んだ前記標本の画像と刺激が与えられた後に取り込んだ各初期状態が異なる複数の細胞を含む前記画像から、細胞の初期状態と刺激による反応との相関情報を生成する生成手段とを備えたものである。

#### 【0007】

なお、前記認定手段は、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した変化に基づき特定し、特定された各細胞毎の前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激手段が前記刺激を与える時期までの経過時間を算出し、該算出結果に基づき前記各細胞毎に前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激手段が前記刺激を与える時期までの経過時間に相当する各細胞の初期状態を認定しても良い。

また、前記認定手段は、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した前記標本からの蛍光に基づく情報の変化に基づき特定し、前記刺激手段による刺激を与えるまでの前記標本からの蛍光に基づく情報の変化から、各細胞の初期状態を認定しても良い。

#### 【0008】

また、前記認定手段は、前記刺激手段が前記刺激を与える前に前記画像取込手段が順に取り込んだ複数の前記画像を参照し、前記複数の細胞の各々の変化に基づいて、前記複数の細胞の各々の初期状態を認定しても良い。

また、前記認定手段は、前記複数の細胞の各々の前記細胞周期の位相ずれを前記初期状態として認定しても良い。

#### 【0009】

本発明の細胞観察方法は、個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程と、前記標本の画像を取り込んだ後、前記標本に所定の刺激を与える工程と、取り込んだ前記標本の画像を基に、刺激を与える前の前記各細胞の細胞周期の中の所定の時期を特定し、前記所定の時期から前記刺激を与える時期までの前記各細胞に基づいて、前記各細胞の初期状態を認定する工程と、前記標本に刺激を与えた後に前記標本の画像を取り込み、刺激が与えられた後の前記標本の画像に基づいて、前記刺激に対する前記標本の反応を検出する工程と、刺激

10

20

30

40

50

を与える前に取り込んだ前記標本の画像と刺激が与えられた後に取り込んだ各初期状態が異なる複数の細胞を含む前記画像から、細胞の初期状態と刺激による反応との相関情報を生成する工程とを備えたものである。

【0010】

なお、前記各細胞の初期状態を認定する工程では、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した変化に基づき特定し、特定された各細胞毎の前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激を与える時期までの経過時間を算出し、該算出結果に基づき前記各細胞毎に前記細胞周期の中の所定の時期から前記刺激を与える時期までの経過時間に相当する各細胞の初期状態を認定しても良い。

【0011】

また、前記各細胞の初期状態を認定する工程では、前記所定の時期を前記複数の細胞の各々の細胞周期に連動した前記標本からの蛍光に基づく情報の変化に基づき特定し、刺激を与えるまでの前記標本からの蛍光に基づく情報の変化から、各細胞の初期状態を認定しても良い。

また、前記個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程では、複数の前記画像を順に取り込んで良い。

【0012】

また、前記個々の細胞の状態が周期的に変化する細胞集団であって周期の中の時期が各々異なる複数の細胞を含む標本の画像を取り込む工程では、前記複数の細胞の各々の前記細胞周期の位相ずれを前記初期状態として認定しても良い。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、同調培養法を用いることなく簡単に細胞の初期状態と反応との相関関係を調べることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、図面を用いて本発明の実施形態を詳細に説明する。

本実施形態の細胞観察装置10は、図1に示すように、電動XYステージ11と、保温容器12と、ピペット装置13と、透過照明部(14,15)と、落射照明部(16~19)と、光学顕微鏡部(20~22)と、コンピュータ23とで構成されている。電動XYステージ11には、例えば透明ポリスチレン製で96個のウエル25を有するマイクロプレート24が載置されている。

【0016】

マイクロプレート24の各々のウエル25の中には、多数の細胞(生細胞)を含む標本が入っている。細胞は、ウエル25の底部に沈んでいる。ここで、ウエル25の中の細胞の培養は、周知の同調培養法のような煩雑な作業を伴う方法ではなく、一般的で簡易な方法により行われる。このため、各々のウエル25の中で、多数の細胞の状態(例えば細胞周期の分裂期(M期)のタイミング)は、不均一となっている。

【0017】

電動XYステージ11は、マイクロプレート24をXY方向に移動させて、96個のウエル25のうち何れか1つを観察光路10Aに位置決めする機構である。この電動XYステージ11により、各々のウエル25の中心部を観察光路10Aに順に位置決めすることができる。本実施形態の細胞観察装置10では、電動XYステージ11とマイクロプレート24とが保温容器12の内部に配置される。

【0018】

保温容器12は、断熱材料の壁に吸気口26と排気口27,28とを設けたものである。吸気口26は側方に配置され、排気口27,28は観察光路10Aに沿って上側と下側に配置される。保温容器12の内部には、吸気口26から十分な量の空気(温度37℃,湿度100%,炭酸ガス5%)が供給される。このため、排気口27,28から逃げる空

10

20

30

40

50

気が多少あっても、保温容器 12 の内部は常に一定の条件に保たれる。

【0019】

したがって、マイクロプレート 24 のウエル 25 の中の細胞を一定の条件で観察することができる。なお、株化した培養細胞は、同じ条件下において、細胞周期の長さが一定になる（例えば 24 時間）。この場合、各々のウエル 25 の中で、多数の細胞の状態の不均一性は、例えば細胞周期の位相ずれや、細胞周期のうち分裂期の時間ずれとなって現れる。炭酸ガス濃度を一定にするのは溶液の pH を一定にするためである。

【0020】

保温容器 12 の上側には、ピペット装置 13 と透過照明部 (14, 15) が配置されている。ピペット装置 13 と透過照明部 (14, 15) は、不図示のステージにより例えば X 方向に沿って移動可能である。そして、ピペット装置 13 または透過照明部 (14, 15) が、観察光路 10A に挿入される。図 1 には、透過照明部 (14, 15) が観察光路 10A に挿入された状態を示す。

10

【0021】

ピペット装置 13 は、不図示の薬物保管ウエルから規定量の薬物（蛋白やアセチルコリンなど）を吸い上げた後、その薬物をマイクロプレート 24 のウエル 25 の中に導入する装置である。ピペット装置 13 による薬物導入の際、観察光路 10A にはピペット装置 13 が挿入される。そして、マイクロプレート 24 の 96 個のウエル 25 のうち、観察光路 10A に位置決めされた 1 つのウエル 25 に、保温容器 12 の排気口 27 を介して薬物が導入される。

20

【0022】

透過照明部 (14, 15) は、光源 14 とコンデンサレンズ 15 とで構成され、透過照明により細胞を観察する際、観察光路 10A に挿入される。このとき、光源 14 からの照明光は、コンデンサレンズ 15 と保温容器 12 の排気口 27 を介した後、マイクロプレート 24 の 96 個のウエル 25 のうち、観察光路 10A に位置決めされた 1 つのウエル 25 に入射して、その中の細胞を照明する。なお、細胞を透過した光は、保温容器 12 の下側の排気口 28 を通過した後、光学顕微鏡部 (20 ~ 22) に導かれる。

【0023】

保温容器 12 の下側には、光学顕微鏡部 (20 ~ 22) の他に、落射照明部 (16 ~ 19) が配置されている。落射照明部 (16 ~ 19) は、光源 16 と励起フィルタ 17 とダイクロイックミラー 18 と蛍光フィルタ 19 とで構成され、落射照明により細胞を観察するために、観察光路 10A に挿入されている。

30

このとき、光源 16 からの照明光は、励起フィルタ 17 とダイクロイックミラー 18 を介して観察光路 10A に導かれ、光学顕微鏡部 (20 ~ 22) の対物レンズ 20 と保温容器 12 の排気口 28 を介した後、マイクロプレート 24 の 96 個のウエル 25 のうち、観察光路 10A に位置決めされた 1 つのウエル 25 に入射して、その中の細胞を照明する。落射照明の場合、細胞に予め導入された蛍光色素が照明光により励起される。なお、蛍光色素から放射された蛍光は、再び保温容器 12 の下側の排気口 28 を通過した後、光学顕微鏡部 (20 ~ 22) に導かれる。

【0024】

光学顕微鏡部 (20 ~ 22) は、対物レンズ 20 と結像レンズ 21 とカメラ 22 とで構成される。上記の透過照明によりウエル 25 の中の細胞を透過した光は、対物レンズ 20 と結像レンズ 21 を介してカメラ 22 に入射する。上記の落射照明によりウエル 25 の中の細胞（蛍光色素）から放射された蛍光は、対物レンズ 20 とダイクロイックミラー 18 と蛍光フィルタ 19 と結像レンズ 21 を介してカメラ 22 に入射する。何れの場合にも、カメラ 22 の撮像面には細胞の拡大像が形成される。カメラ 22 は、この拡大像を撮像し、画像データをコンピュータ 23 に出力する。

40

【0025】

コンピュータ 23 は、カメラ 22 から出力される画像データに基づいて、標本（多数の細胞を含む）の画像を取り込み、この画像を撮影時間と共にハードディスクに記憶させる

50

。なお、コンピュータ23には、カメラ22から画像を取り込むタイミングを指定したり、取り込んだ画像に基づいて薬物による細胞の反応を観察する手順を記載した細胞観察プログラムが格納されている。

【0026】

次に、本実施形態の細胞観察装置10の動作を説明する。コンピュータ23は、内部に格納された細胞観察プログラムを参照しながら、図2のフローチャート(ステップS1~S5)の手順にしたがって、薬物による細胞の反応の観察を行う。

まず(ステップS1)、透過照明部(14,15)が観察光路10Aに挿入され、ピペット装置13が観察光路10Aの外に配置された状態で、コンピュータ23は、透過照明による標本の画像(位相差顕微鏡画像に相当)を間欠的に取り込む。

10

【0027】

具体的には、電動XYステージ11によりマイクロプレート24をXY方向に移動させて、96個のウエル25の中央部を順に観察光路10Aに位置決めし、各々の状態で標本の画像を取り込む。そして、これらの画像を撮影時間と共にハードディスクに記憶させる。さらに、マイクロプレート24の全てのウエル25の撮影動作が一通り終了すると、再び1つ目のウエル25から順に同じ撮影動作を繰り返す。96個のウエル25の撮影動作を繰り返し行うことにより、各々のウエル25の同一視野内の画像を間欠的に(例えば2分おきに)取り込むことができる。

【0028】

本実施形態では、ステップS1の撮影動作を例えば24時間継続して行う。その結果、コンピュータ23のハードディスクには、各々のウエル25ごとに、同一視野内の画像が例えば720枚蓄積される(撮影間隔は2分)。各々の画像には撮影時間の情報が対応づけられている。なお、24時間とは細胞周期の長さに対応する。このため、各々のウエル25の中の多数の細胞は、ステップS1の撮影動作を継続している間に、約1回ずつ分裂することになる。

20

【0029】

上記したように、各々のウエル25の中で、多数の細胞の状態は不均一であり、各々の細胞の分裂のタイミングも不均一である(つまり時間ずれがある)。ステップS1の結果、ハードディスクに蓄積された各ウエル25ごとの720枚の画像は、ウエル25の中の多数の細胞の各々の分裂期(M期)を特定するために用いられる。分裂期の特定は、後述の

30

【0030】

次に(ステップS2)、透過照明部(14,15)を観察光路10Aから退避させ、ピペット装置13を観察光路10Aに挿入させた状態で、電動XYステージ11によりマイクロプレート24をXY方向に移動させながら、コンピュータ23は、ピペット装置13から96個のウエル25の各々の中に薬物を導入し、各ウエル25の中の多数の細胞に一括で刺激を与える。薬物の種類や濃度は、全てのウエル25で異なってもいいし、同一種類の薬物を複数のウエル25に導入してもよい。また、薬物は、各ウエル25に1種類とは限らず、各ウエル25に複数の種類の薬物を複数回に分けて導入してもよい。コンピュータ23は、各ウエル25ごとに、薬物の導入時間を記録する。

40

【0031】

ここで、各々のウエル25の中で多数の細胞の状態(つまり細胞周期の中の時期)は不均一なため、ステップS2のように一括で薬物が導入されるということは、各々の細胞ごとに、初期状態(刺激を与える前の状態)が異なることを意味する。なお、初期状態が異なる細胞どうしは、薬物による反応も異なる(図4参照)。初期状態が同じ細胞どうしは、薬物による反応も同じである。

【0032】

次に(ステップS3)、電動XYステージ11によりマイクロプレート24をXY方向に移動させながら、コンピュータ23は、落射照明による標本の画像(蛍光画像に相当)を間欠的に取り込む。そして、これらの画像に基づいて、多数の細胞の各々の薬物による

50

反応を検出する。反応の検出は、例えば蛍光画像から各々の細胞の領域を抽出した後、各々の細胞の領域の輝度変化を計算することにより行われる。薬物による反応とは、薬物の効果に相当する。

【0033】

次に(ステップS4)、コンピュータ23は、ステップS1で各ウエル25ごとに取得した720枚の画像に基づいて、ウエル25の中の多数の細胞の各々の分裂期(M期)を特定し、各々の分裂期から薬物導入までの経過時間を算出する。この経過時間は、各々の細胞の分裂期(M期)の時間ずれに相当し、換言すれば、細胞周期の位相ずれに相当する。また、各々の細胞の初期状態(刺激を与える前の状態)と考えることもできる。つまり、ステップS4では、各々の細胞の分裂期(M期)から薬物導入までの経過時間が初期状態として認定されたことになる。

10

【0034】

ここで、分裂期(M期)を特定するための画像処理について説明する。一般に、個々の細胞は、細胞周期の中で図3のような形態変化を示す。つまり、分裂していないときは広がっているが、分裂期には、略円形状となって面積が小さくなる。このように、細胞周期に連動した形態変化(図3)のうち分裂期が最も他と区別しやすいため、細胞の面積に関する特徴量を画像処理ソフトによって解析することで、細胞の分裂期を容易に特定できる。ただし、細胞の面積に関する特徴量を求める前に、画像から各々の細胞の領域を抽出することが必要となる。

【0035】

20

コンピュータ23は、各々の細胞の分裂期(M期)から薬物導入までの経過時間(つまり各々の細胞の初期状態)を認定し終わると、最後のステップS5に進み、各々の細胞の経過時間(初期状態)と、ステップS3で検出した各々の細胞の反応(薬物の効果)との関連情報を生成する。そして、薬物による反応の観察処理を終了する。

このように、本実施形態の細胞観察装置10によれば、各ウエル25内の多数の細胞が不均一な状態で同時に薬物を導入して個別に反応を検出するため、同調培養法を用いることなく簡単に細胞の初期状態と反応との関連関係を調べることができる。

【0036】

また、本実施形態の細胞観察装置10によれば、標本の培養容器としてマイクロプレート24を用いるため、医薬品の開発過程におけるスクリーニングの際、多種類の薬物による細胞の反応を効率よく観察できる。

30

(変形例)

上記した実施形態では、各々の細胞の分裂期から薬物導入までの経過時間を初期状態として認定したが、本発明はこれに限定されない。その他、各々の細胞の分裂期の時間ずれか、細胞周期の位相ずれを初期状態として認定してもよい。位相ずれを初期状態として認定する場合、分裂期以外の時期を基準にしてもよい。さらに、刺激を与える直前の各々の細胞の状態(細胞周期の中の時期)を初期状態として認定してもよい。この場合、細胞周期と薬物の効果との関連関係が明確になる。

【0037】

また、上記した実施形態では、細胞の分裂期を特定する際、細胞の面積に関する特徴量を解析したが、本発明はこれに限定されない。その他、細胞膜を特異的に染色する蛍光試薬(Diphenyl-Hexatriene(DPH)など)を使用して、落射照明により細胞膜の蛍光画像を取り込み、その形態変化(つまり形状変化)に基づいて分裂期を特定してもよい。細胞膜が円形状の時期が分裂期である。他に、細胞核を特異的に染色する蛍光試薬(Hoechst33342)を使用して、落射照明により細胞核の蛍光画像を取り込み、その形状変化から分裂期の細胞を同定してもよい。細胞核は、間期(分裂期以外)には長円型であるが、分裂期になると凝集して小さくなるので、容易に判別できる。

40

【0038】

さらに、上記のような細胞周期に関わるパラメータ(例えば経過時間など)に限らず、次のような特徴を細胞の初期状態(刺激を与える前の状態)として認定してもよい。例え

50

ば、各々の細胞で発現したカルモジュリン量（GFP標識したカルモジュリン）を指標にしてもよい。アポトーシス(apoptosis)を生じるような免疫細胞との接触による「FasリガンドとFasとの相互作用」によって活性化される細胞内カスパーゼを検出してもよい。p53蛋白質の増減を検出することにより、アポトーシスカスケードの起動を検出してもよい。リソソーム病のように体内の特定の加水分解酵素に異常が生じるような現象を検出してもよい。この場合、染色された水溶性物質を取り込ませることなどにより、エンドサイトーシスにより取り込まれた初期エンドソームの動態を画像化し、それらの蛍光観察により細胞内への蓄積などを知ることができる。上記は蛍光の濃度や形態などを検出することが主となる。結合物質とリガンドの変化の検出には、FRET（蛍光エネルギー移動）などによるスペクトル変化の検出を用いても、時間分解測定装置により蛍光寿命の変化を検出してもよい。

10

#### 【0039】

さらに、個々の細胞の反応の中には、蛍光カルシウム指示薬の画像情報から求められる細胞内カルシウムイオン濃度の変化、または、膜電位感受性色素の画像情報から求められる膜電位の変化、カスパーゼ標識試薬の画像情報から求められるアポトーシス、蛍光標識した蛋白質キナーゼの細胞内分布変化、細胞の移動、細胞の死滅による消失が含まれる。

また、上記した実施形態では、細胞の初期状態（刺激を与える前の状態）を認定するために、複数の画像を間欠的に取り込んだが、本発明はこれに限定されない。1枚の画像に基づいて細胞の初期状態（刺激を与える前の状態）を認定してもよい。

#### 【0040】

20

さらに、上記した実施形態では、薬物を導入することにより、各々の細胞に刺激を与えたが、本発明はこれに限定されない。その他、温度変化刺激（ヒートショックプロテインなど）、機械的刺激（細胞の伸縮刺激など）、光刺激（視細胞など）、電気刺激などによる細胞の反応を観察する装置にも、本発明は適用できる。

また、上記した実施形態では、落射照明によって細胞の反応を観察したが、透過照明によって反応を観察することもできる。この場合には、刺激を与えた後、ピペット装置13を観察光路10Aから退避させ、透過照明部(14,15)を再び観察光路10Aに挿入させることになる。

#### 【0041】

さらに、上記した実施形態では、反応を1種類に限ったが、1つの刺激に対する複数の反応を画像情報から抽出してもよく、これら複数の反応と初期状態との相関情報を出力してもよい。例えば、反応としては、蛍光カルシウム指示薬の画像情報から求められる細胞内カルシウムイオン濃度の変化と、カスパーゼ標識試薬の画像情報から求められるアポトーシスでもよい。

30

#### 【0042】

また、複数の細胞とは、1種類の細胞で状態が異なるものだけを示すのではなく、複数種の細胞（例えばグリア細胞と神経細胞）が混在してものでもよい。

さらに、上記した実施形態では、透過照明部(14,15)と落射照明部(16~19)とを備えた細胞観察装置10を例に説明したが、本発明はこれに限定されない。透過照明部(14,15)と落射照明部(16~19)との何れか一方を備えた細胞観察装置にも本発明を適用できる。また、落射照明部(16~19)のうち、励起フィルタ17とダイクロイックミラー18と蛍光フィルタ19を不図示のステージにより例えばX方向に沿って移動可能に構成し、透過照明による画像取り込み時に観察光路10Aの外に退避させもよい。

40

#### 【0043】

また、上記した実施形態では、薬物を導入する前に取り込んだ画像を図2のステップS4で読み出し、細胞の初期状態を認定したが、本発明はこれに限定されない。細胞の初期状態の認定タイミングは、ステップS1とステップS2の間でも構わない。

さらに、保温容器12内の条件を一定にするためには、上記例に限らず、電熱器や蒸気発生装置を保温容器内に設置し、そのON/OFFによって温度湿度を制御してもよい。炭酸ガス濃度を一定にする他の方法としては、電磁弁を通じて炭酸ガスを供給し、電磁弁

50

の開閉により炭酸ガス濃度を制御することが考えられる。

【0044】

また、保温容器の排気口27, 28は、開口部に限らず、ガラス窓としてもよい。この場合、上側の排気口27は開閉可能とすることが好ましい。排気口27のガラス窓は、透過照明での観察時に閉めておき、ピペット装置13で薬物を導入するときには開放される。

また、薬物導入用のピペット装置は、単一先端を持つ装置に限らず、複数先端を持つ装置でもよい。この場合、マイクロプレートの複数のウエルに同時に試薬を導入できる。

【0045】

さらに、薬物を導入するためには、上記例に限らず、細胞培養液中に2本の管を挿入し、一方から薬物の混入した培養液を導入し、他方から余剰の培養液を吸引する構成が考えられる。また、マイクロプレート24に代えてシャーレを標本の培養容器として用いてもよい。

10

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】細胞観察装置10の全体構成を示す図である。

【図2】細胞の反応の観察手順を示すフローチャートである。

【図3】細胞周期に連動した形態変化を示す概略図である。

【図4】従来の手法を用いて細胞の初期状態と反応との相関関係を調べた結果である。

20

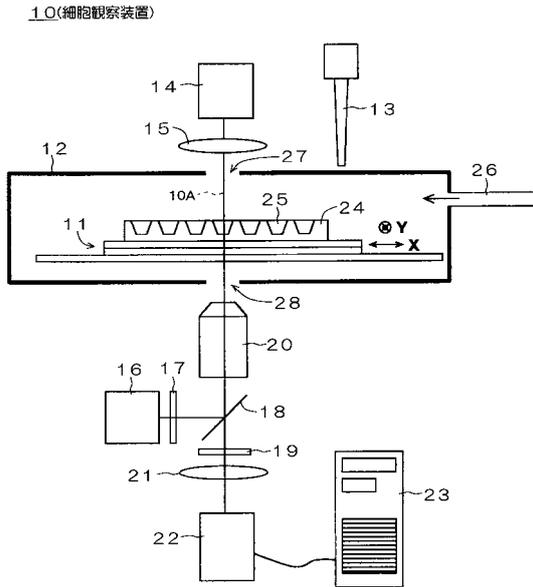
【符号の説明】

【0047】

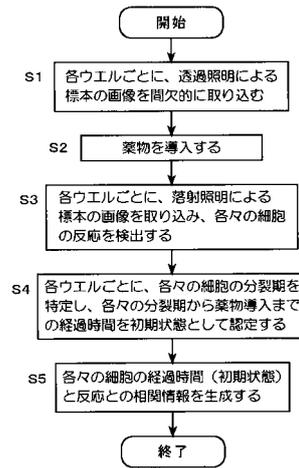
- 10 細胞観察装置
- 11 電動XYステージ
- 12 保温容器
- 13 ピペット装置
- 14, 16 光源
- 15 コンデンサレンズ
- 17 励起フィルタ
- 18 ダイクロイックミラー
- 19 蛍光フィルタ
- 20 対物レンズ
- 21 結像レンズ
- 22 カメラ
- 23 コンピュータ
- 24 マイクロプレート
- 25 ウエル
- 26 吸気口
- 27, 28 排気口

30

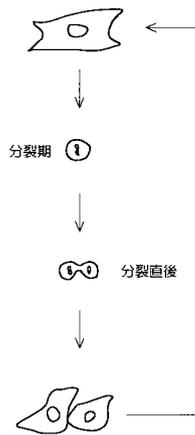
【図1】



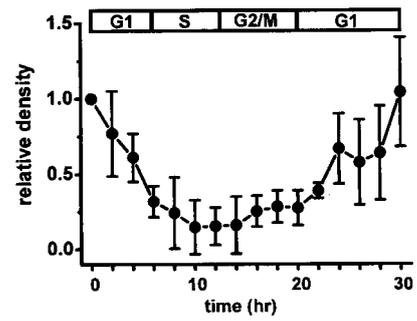
【図2】



【図3】



【図4】



---

フロントページの続き

(72)発明者 今泉 祐治  
愛知県名古屋市瑞穂区下山町一丁目75番地の4

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2003-500664(JP,A)  
特表2003-506098(JP,A)  
特開2002-355090(JP,A)  
特開2002-218995(JP,A)  
特開平06-138118(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12M1/00 3/10  
C12Q1/00-1/68  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus(JDreamII)