

(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
2016年4月28日(28.04.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/063364 A1

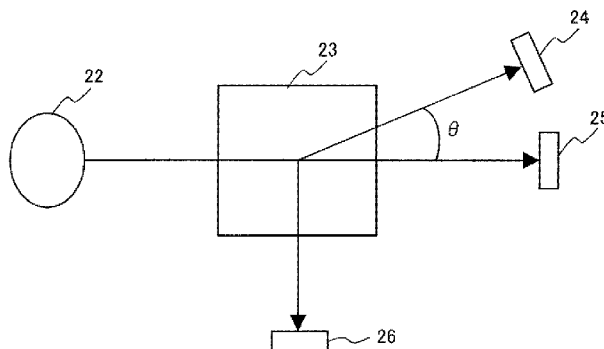
- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
G01N 21/49 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/078033
- (22) 国際出願日: 2014年10月22日(22.10.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社日立ハイテクノロジーズ(HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 河原井 雅子(KAWARAI Masako); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 桜井 智也(SAKURAI Toshinari); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 島瀬 明大(SHIMASE Akihiro); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP). 越 裕之(KOSHI Hiroyuki); 〒1058717 東京都港区西新橋一丁目2番14号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: ポーレル特許業務法人(POLAIRE I.P.C.); 〒1040032 東京都中央区八丁堀二丁目7番1号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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),

[続葉有]

(54) Title: CYTOMETRIC MECHANISM, CELL CULTURE DEVICE COMPRISING SAME, AND CYTOMETRIC METHOD

(54) 発明の名称: 細胞計測機構及びそれを有する細胞培養装置並びに細胞計測方法

[図3]



(57) Abstract: The present invention provides a cytometric mechanism, cell culture device, and cytometric method with which it is possible to measure a cell survival rate or the like rapidly and at high accuracy, in a manner not dependent on a worker's skill level and without having to stain cultured cells. A cytometric mechanism 16 comprises: a flow path through which a cell suspension is made to flow; a liquid drive unit 7 for sending the cell suspension which is in the flow path; and a computation unit 18 for irradiating, with irradiation light from a light source 22, a cell suspension flowing through a flow cell 23, and for finding a cell survival rate in the cell suspension on the basis of a resulting forward scattered light intensity and transmittance and/or side scattered light intensity. The invention is provided with a calibration curve database 18d for storing, in advance, respective calibration curves indicative of a relationship between viable cell concentration and forward scattered light intensity, a relationship between dead cell concentration and the transmittance, and a relationship between a cell survival rate and the side scattered light intensity.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2016/063364 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明は、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、細胞生存率等の計測を高精度かつ迅速に実行し得る細胞計測機構及び細胞培養装置、並びに細胞計測方法を提供することにある。細胞計測機構 16 は、細胞懸濁液を通流させる流路と、流路内の細胞懸濁液を送液する液体駆動部 7 と、フローセル 23 内を通流する細胞懸濁液に光源 22 より照射光を照射し、得られる前方散乱光強度並びに透過率及び／又は側方散乱光強度に基づき、細胞懸濁液中の細胞生存率を求める演算部 18 を有する。生細胞濃度と前方散乱光強度との関係、死細胞濃度と前記透過率との関係、及び細胞生存率と前記側方散乱光強度との関係を示す各校正曲線を予め格納する校正曲線 DB 18 d を備える。

明 細 書

発明の名称：

細胞計測機構及びそれを有する細胞培養装置並びに細胞計測方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞計測機構及びそれを有する自動細胞培養装置、並びに細胞計測方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、細胞培養は、ほとんどの操作が手作業により行われてきたが、細胞培養操作は煩雑であり時間がかかるため多大な人的コストを必要としている。特に、細胞計数と細胞生存率測定は、煩雑で困難な作業であり、作業者の熟練度が必須である。

[0003] そこで、特許文献1に示すセルカOUNTERのように、トリパンブルー色素染色した培養細胞の画像データに基づいて、細胞数の計数と細胞生存率等を自動で算出する方法が提案されている。

[0004] また、特許文献2には、複数波長のレーザー光源と複数回のインフロー光学測定（フローサイトメータ）を用いることにより、全血中の赤血球、白血球、血小板を同定し定量する方法が示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2013-517460号公報

特許文献2：特表2012-525589号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1に記載されるセルカOUNTERを使用して細胞数の計数を試みると、従来の血球計算盤による計数に比べ精度が向上する。しかし、我々の実験結果によると、細胞懸濁液の細胞濃度が $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 以下及び $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上の濃度領域では、計数結果の信頼性が極端

に低下した。細胞培養装置を再生医療や細胞治療に適用する場合、細胞濃度が $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 以下の検体を計測する必要がある。しかしながら、特許文献 1 によるセルカウンターは、この濃度領域内における計測精度が低く適用できなかった。また細胞生存率は、細胞輪郭のコントラストにより細胞の生死を判別しているが、活性の低下した細胞（以下、低活性の生細胞）は細胞輪郭のコントラストが低く、生死判断が困難である。すなわち、継代培養における細胞懸濁液中の細胞生存率を計測することはできない。

[0007] また、特許文献 2 に示されるフローサイトメータを用いた細胞計測方法では、1 個の細胞毎に測定する必要があるため、多大な時間を要する。

一方、再生医療あるいは細胞治療を目的とし細胞培養をおこなう場合、安全性が確認できていないため治療に供する細胞を染色することはできない。従って、色素で細胞を染色することを必須とする特許文献 1 による細胞計測方法では、このような細胞培養に適用することは困難である。また、上述のとおり特許文献 2 による細胞計測方法では、計測に多大の時間を要するため、細胞培養装置に適用することは困難となる。

そこで本発明は、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、少なくとも細胞生存率の計測を高精度かつ迅速に実行し得る細胞計測機構及びそれを有する細胞培養装置、並びに細胞計測方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するため、本発明の細胞計測機構は、細胞懸濁液を通流させる流路と、前記流路内の細胞懸濁液を送液する液体駆動部と、前記流路内で流動中の細胞懸濁液に光源より照射光を照射し、得られる前方散乱光強度並びに透過率及び／又は側方散乱光強度に基づき、少なくとも前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求める演算部を有することを特徴とする。

[0009] また、本発明の細胞培養装置は、細胞を培養し増殖させ、増殖させた細胞を剥離する拡大培養機構と、前記拡大培養機構により剥離された細胞を含む細胞懸濁液を通流させる流路と、前記流路内の細胞懸濁液を送液する液体駆

動部と、前記流路内で流動中の細胞懸濁液に光源より照射光を照射し、得られる前方散乱光強度並びに透過率及び／又は側方散乱光強度に基づき、少なくとも前記細胞懸濁液中の細胞生存率を算出する演算部を有する細胞計測機構と、を備えることを特徴とする。

[0010] また、本発明の細胞計測方法は、細胞懸濁液中の少なくとも細胞生存率を求める細胞計測方法であって、

フローセル内を通流する細胞懸濁液に対し、前記細胞懸濁液の流れに直交する方向より光源から照射光を照射する工程と、前記細胞懸濁液より散乱する前方散乱光強度を測定する工程と、前記細胞懸濁液を透過する前記照射光の透過率を測定する工程と、前記測定された前方散乱光強度及び予め記憶された生細胞濃度と前記前方散乱光強度との関係を示す第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度を求める工程と、前記測定された前記透過率及び予め記憶された死細胞濃度と前記透過率との関係を示す第2の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の死細胞濃度を求める工程と、前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求める工程と、を有することを特徴とする。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、少なくとも細胞生存率の計測を高精度かつ迅速に実行し得る細胞計測機構及びそれを有する細胞培養装置、並びに細胞計測方法を提供することができる。

[0012] 例えば、継代培養細胞を含む細胞懸濁液中の細胞生存率を、細胞培養装置内に配するフローセル内で、非染色にて迅速に計測することが可能となる。

[0013] 上記した以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の一実施形態に係る細胞培養装置の全体構成図である。

[図2]C a c o - 2 細胞の顕微鏡画像であり、生細胞、死細胞及び低活性の生

細胞を含む画像を示す図である。

[図3]図1に示す測定部の光学系の概略構成図である。

[図4]図1に示す制御部の概略構成図である。

[図5]Caco-2細胞懸濁液中の生細胞濃度と前方散乱光強度の関係を示す図であり、校正曲線(1)の説明図である。

[図6]Caco-2細胞懸濁液中の各死細胞濃度における、光源からの照射光の波長と透過率Tとの関係を示すスペクトル図である。

[図7]Caco-2培地中の死細胞濃度と透過率Tの関係を示す図であり、校正曲線の説明図である。

[図8]Caco-2生細胞懸濁液中の死細胞濃度と透過率Tの関係を示す図であり、校正曲線(2)の説明図である。

[図9]Caco-2細胞懸濁液中の培養液及び各細胞生存率における、光源からの照射光の波長と側方散乱光強度との関係を示すスペクトル図である。

[図10]Caco-2生細胞懸濁液中の細胞生存率と側方散乱光強度の関係を示す図であり、校正曲線(3)の説明図である。

[図11]本発明の一実施例に係る実施例1の細胞計測機構による細胞生存率算出処理のフローチャートである。

[図12]本発明の他の実施例に係る実施例2の細胞計測機構による細胞生存率算出処理のフローチャートである。

[図13]本発明の他の実施例に係る実施例3の細胞計測機構による細胞生存率算出処理のフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明者らは鋭意努力の結果、再生医療あるいは細胞治療で使用する培養細胞(継代培養細胞等)の場合、患者あるいは被験者毎の細胞活性の相違又は培養状態(継代培養環境等)により、粒子径の小さい死細胞や、死にかけの細胞あるいは低活性の生細胞が混入する。これらは、活性を有する生細胞と大きさが異なるため、例えば、フローセル中を通流する生細胞懸濁液へ、光源より照射光を照射することで得られる散乱光のみにより正確な細胞数あ

るいは細胞生存率を求めることが困難であるとの知見を得た。そこで、本発明者らは、前方散乱光強度と透過率、あるいは、前方散乱光強度及び透過率並びに側方散乱光強度を用いることで、大きさの異なる上記各種細胞、すなわち、活性を有する生細胞、低活性の生細胞及び死細胞を識別し、細胞数あるいは細胞生存率を高精度かつ迅速に得ることが可能であるとの知見を得たものである。

[0016] 本明細書においては、細胞懸濁液中の生細胞 (*v i a b l e c e l l*) を V_c 、生細胞の濃度を $C V_c$ 、細胞懸濁液中の死細胞 (*d e a d c e l l*) を D_c 、死細胞の濃度を $C D_c$ 、細胞懸濁液中の低活性の生細胞 (*s u b v i t a l c e l l*) を S_c 、低活性の生細胞の濃度を $C S_c$ とそれぞれ、併記あるいは単独で表記する。

[0017] 図1に、本発明の一実施形態に係る細胞培養装置の全体構成図を示す。図1において、細胞懸濁液を通流させる流路を実線で示し、制御信号あるいは計測信号を送受信する信号線を点線で示している。細胞培養装置1は、細胞を培養し増殖させ、増殖させた細胞を剥離する拡大培養機構15、拡大培養機構15により剥離された細胞を分散させ、測定する細胞計測機構16、細胞計測機構16により分散させた細胞懸濁液を拡大培養機構15へ送液する細胞播種機構17、及び制御部18より構成される。なお、後述するように、制御部18は、細胞計測機構16と協働し、計測される前方散乱光強度、透過率及び側方散乱光強度に基づき、細胞懸濁液中の細胞生存率等を演算により求める機能を有する。この点において、制御部18は、細胞計測機構16の一部を構成する。また、制御部18は、拡大培養機構15、細胞計測機構16及び細胞播種機構17を制御する機能も有する。以下では、制御部18が、細胞懸濁液中の細胞生存率、生細胞濃度 ($C V_c$)、及び死細胞濃度 ($C D_c$) を求める機能を有する構成を一例として説明するが、これに限られるものではない。例えば、細胞計測機構16内に上記機能を有する制御演算部を設けても良く、また、後述する測定部6に制御演算部を配する構成としても良い。

[0018] 拡大培養機構 15 は、図示しない CO₂ インキュベータ内に格納されている。同様に、細胞計測機構 16 及び細胞播種機構 17 も CO₂ インキュベータ内に格納する構成としても良い。細胞培養装置 1 内の流路内は閉鎖系で無菌状態とされており、細胞培養装置 1 の動作中において、流路内に導入される空気は、例えば、HEPA フィルタ（図示せず）を介しており、細胞の継代操作等を含む細胞培養を、無菌状態を維持した環境下で実施することができる。

[0019] 拡大培養機構 15 を構成する拡大培養容器 2 にて培養する細胞は、細胞供給部 10 より液体駆動部、例えば、シリンジポンプ等を用いて導入される。培養液供給部 3 より液体駆動部、例えば、しごきポンプ 7 により適量の細胞培養液が導入され、三方バルブ 8 及び流路内を通流し、拡大培養容器 2 へ供給される。その後、拡大培養容器 2 にて培養する細胞が、導入された細胞培養液中で均一の濃度となるよう、容器を揺り動かした後、数日間静置される。培養される細胞は、CO₂ インキュベータ内で適切な条件の下、拡大培養容器 2 内で数日間培養される。拡大培養容器 2 には、培養細胞の増殖状態を観察可能とするため顕微鏡が設置されている。これは、100%コンフルエント状態、すなわち、拡大培養容器 2 の底面全域に培養細胞が増殖すると、それ以上の増殖は行えず、培養細胞の活性が低下するあるいは死滅する恐れがあるからである。一般的には、70%~80%のコンフルエントに達した時点で、培養細胞を剥離することが望ましい。細胞洗浄液供給部 11 は、内部に、PBS (Phosphate Buffered Sline) あるいは HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 緩衝液等、細胞に適した洗浄液を収容する。例えば、シリンジポンプを介して、細胞洗浄液供給部 11 より洗浄液を拡大培養容器 2 内に導入することにより、滞留期間の長い細胞培養液、死細胞又はごみ等が押し出される。押し出された、死細胞を含む細胞培養液は、しごきポンプ 7 を介して廃液 14 として、細胞培養装置 1 の閉鎖系外へと排出される。細胞剥離液供給部 12 は、トリプシン、コ

ラゲナーゼ、ディスパーゼ等のタンパク質分解酵素を収容する。これらタンパク質分解酵素を、拡大培養容器 2 へ導入し一定時間放置する。これらタンパク質酵素により、増殖された培養細胞と拡大培養容器 2 の底面とを接着するインテグリン等のタンパク質が分解され、培養細胞が拡大培養容器 2 より剥離される。細胞剥離溶液阻害剤供給部 13 は、トリプシンインヒビターあるいは細胞培養液等の酵素活性阻害剤を収容する。これら細胞剥離溶液阻害剤を拡大培養容器 2 へ導入することにより、培養細胞剥離後のタンパク質分解酵素の活性を停止させ、酵素活性による培養細胞へのダメージの低減が図られる。

[0020] 試料導入部 4 は、拡大培養容器 2 の底面より剥離された培養細胞を、しごきポンプ 7、三方バルブ 8 を介して回収する。このとき、拡大培養容器 2 の底面に培養細胞の残渣が多い場合には、培養液供給部 3 より導入される細胞培養液により共洗いし、その後、試料導入部 4 に回収することで、培養細胞の回収率を向上することが可能となる。

[0021] 試料供給部 4 に回収された培養細胞は、シリンジポンプ（図示せず）等の液体駆動部及び三方バルブ 8 を介して、細胞計測機構 16 の循環流路内に細胞懸濁液として導入される。細胞計測機構 16 は、分散部 5、液体駆動部としてのしごきポンプ 7、及び測定部 6 より構成される。これら分散部 5、しごきポンプ 7 及び測定部 6 は、循環流路にて接続されている。培養する細胞種によりその凝集性が異なり、仮に、凝集性の高い細胞種を培養する場合、細胞計測機構 16 の循環流路内に導入される細胞懸濁液に含まれる培養細胞（以下、単に細胞と称す）は、塊状となって循環流路を通流することとなる。そこで、液体駆動部としてのしごきポンプ 7 により、三方バルブ 8 を介して、分散部 5 へ導入され、塊状から分散された後、細胞懸濁液は測定部 6 へ導入される。ここで、分散部 5 は、例えば、流路径が急激に縮小する狭窄部あるいは、オリフィス等の仕切り板を流路内に設けることで形成される。これら狭窄部あるいはオリフィスを細胞懸濁液が通流する際、せん断力（シェアストレス）により、塊状の細胞は分散される。なお、低凝集性の細胞種を

培養する場合においては、必ずしも細胞計測機構 16 内に分散部 5 を配する必要はなく、測定部 6、しごきポンプ 7 及び三方バルブ 8 を循環流路で接続することで、細胞計測機構 16 を構成すれば良い。

[0022] 細胞播種機構 17 は、一端が拡大培養容器 2 と、他端が細胞計測機構 16 内の循環流路に三方バルブ 8 を介して接続される流路に、三方バルブ 8 を介して接続される細胞播種試料調整部 9 を備える。細胞播種試料調整部 9 は、細胞計測機構 16 内の循環流路内を通流する細胞懸濁液中の細胞濃度を調整するために配されている。すなわち、細胞懸濁液中の細胞濃度が所望の細胞濃度となるよう、液体駆動部であるしごきポンプ 7 を駆動し、一端が拡大培養容器 2 に接続される流路を介して、拡大培養容器 2 の底面より剥離された細胞を含む細胞懸濁液を、三方バルブ 8 を介して細胞播種試料調整部 9 内に取り込む。その後、しごきポンプ 7 の駆動により培養液供給部 3 より三方バルブ 8 を介して所望量の細胞培養液を、細胞播種試料調整部 9 に導入し、既に、取り込まれた細胞懸濁液と混合し希釈する。そして、希釈後の細胞懸濁液を細胞計測機構 16 の循環流路へ送液し、詳細は後述する測定部 6 により、前方散乱光強度、透過率、及び側方散乱光強度が計測される。

[0023] ここで、細胞懸濁液に含まれる、生細胞 (Vc)、低活性の生細胞 (Sc) 及び死細胞 (Dc) について説明する。図 2 に、ヒト大腸がん細胞株である Caco-2 細胞の顕微鏡画像を示す。図 2 に示す顕微鏡画像は以下の条件にて得られた Caco-2 細胞の画像である。Caco-2 細胞を 100%コンフルエント以上に培養し、接着している細胞を剥離せずに培養液中に浮遊している細胞を回収した。この状態の培養細胞のほとんどは活性が低下し、細胞の一部が剥離し、細胞培養液中に死細胞が多く浮遊している。細胞培養液の一部をとり、セルカウンターを使用して細胞濃度と生存率を測定したところ、細胞濃度 $5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、生存率 20%であった。この試料をスライドガラスに滴下しカバーガラスにより固定後、倒立顕微鏡を使用して対物レンズ 20 倍で撮影した画像が図 2 に示す顕微鏡画像である。図 2 に示すように、まだ活性を有する生細胞 (Vc) 19、低活性の生細胞

(Sc) 20、活性を有さず死滅した死細胞(Dc) 21が観察される。生細胞(Vc) 19は白く光り、大きな粒径であるのに比べ、死細胞(Dc) 21は全体的に黒く着色し、粒子状でなくなったものが多い。また、細胞膜がはっきりせず細胞内部の構造が変化している様子が観察される。大きく見えても粒子状ではないため光を散乱しにくい。低活性の生細胞(Sc) 20は、生細胞(Vc) 19と死細胞(Dc) 21の中間の状態で、白く光ってはいるものの、その粒径は生細胞(Vc) 19より小さいことがわかる。

[0024] 図2に示す、生細胞(Vc)、低活性の生細胞(Sc)及び死細胞(Dc)は、Caco-2細胞の場合であるが、ここで細胞種に依る粒径の相違について説明しておく。生細胞(Vc)の粒径は、NIH/3T3細胞では約10 μ m、上述のヒト大腸がん細胞株(Caco-2細胞)あるいはヒト口腔粘膜上皮細胞は約14 μ m、ヒト骨格筋筋芽細胞は約20 μ mである。また、ヒト間葉系幹細胞は約10~50 μ m及びヒト軟骨細胞は約10 μ mである。

[0025] 次に、図1に示す細胞計測機構16を構成する測定部6について説明する。図3に、測定部6の光学系の概略構成図を示す。本実施形態における測定部6は、内部に細胞懸濁液を通流するフローセル23、フローセル23を通流する細胞懸濁液の流れの方向に対し直交するよう配される光源22、フローセル23を挟み光源22と対向する位置、すなわち、光源から照射される照射光の光軸に検出器の受光面が対向するよう配される透過率検出器25を備える。また、測定部6は、透過率検出器25側であって、照射光の光軸に対し所定の角度 θ (前方散乱検出角度)をもって配される前方散乱光検出器24、及び照射光の光軸に垂直な軸上に配され、その軸がフローセル23の略中心を通り、フローセル23より所定の距離離間した位置に配される側方散乱光検出器26を有する。ここで、光源22として、例えば、分光光度計、散乱光度計、蛍光光度計、フローサイトメータ又は粒度分布測定装置等を用いられる、レーザー光源、LED光源、タングステンランプ、あるいはキセノンランプ等が使用できる。

[0026] ここで、前方散乱光とは、光源 22 の光軸に対して前方方向に散乱される光であり、計測される前方散乱光強度は粒子の大きさを反映している。また、光軸とのなす角、すなわち、前方散乱検出角度 θ は、粒子径に依存する。従って、例えば、上述の細胞種毎の生細胞 (Vc) の粒子径に最適となるよう、予め前方散乱検出角度 θ を調整し、前方散乱光検出器 24 を配する。このように、細胞種の生細胞 (Vc) の粒子径に適した角度で散乱する前方散乱光強度を測定すれば、同じ大きさの粒子径の生細胞 (Vc) であれば散乱光強度は、生細胞 (Vc) の濃度 (CVc) に比例する。また、前方散乱光の測定には、細胞 (生細胞 (Vc)) の大きさに応じて光源波長を選択する必要がある。細胞の粒子径に合った波長のとき前方散乱光強度が細胞濃度に依存して変化しやすく、粒子径の大きな細胞ほど長波長の光を照射することが望ましい。光源 22 からの照射光は、レーザー光のような平行光が望ましい。

[0027] また、細胞が活性の高い状態から低い状態、すなわち生細胞 (Vc) から死細胞 (Dc) に変化する過程で細胞内部の色が黒っぽく変化する。そのため細胞懸濁液中の死細胞 (Dc) の含有率が増すにつれ、細胞懸濁液を透過する光量が減衰する。よって、透過率検出器 25 により透過率を測定することで、死細胞 (Dc) の濃度 (CDc) を得ることができる。透過率測定において、紫外光付近では、細胞懸濁液中のあらゆる有機成分の吸収が重なるため、死細胞 (Dc) のみを正確に評価することが困難となる。また、図 1 に示す培養液供給部 3 より拡大培養容器 2 へ導入される細胞培養液には、pH 判定のためにフェノールレッドなどの pH 指示薬が添加されている。そのため細胞培養液は黄色～赤色に着色されており、可視光領域の波長では細胞培養液の色の影響を受けて透過率が大きく低下する。これらを考慮し長波長領域で透過率検出器 25 により透過率を検出すれば、生細胞懸濁液中の死細胞 (Dc) の濃度 (CDc) を、妨害成分の影響を受けることなく安定して計測することができる。

[0028] 更にまた、生細胞 (Vc) と死細胞 (Dc) とでは、細胞内の顆粒密度や

内部構造が異なる。側方散乱光は、上述のとおり光源 22 の光軸に対して 90° の角度で検出される光であり、粒子の密度・形態を反映している。従って、細胞内の物質に照射光が照射されることにより散乱する側方散乱光強度の相違は、細胞生存率を反映することになる。細胞懸濁液中の側方散乱光スペクトルを測定すると、紫外領域（230 nm～310 nm 付近）に細胞質の有機成分に由来するなだらかなピークが検出され、可視光領域の波長に近づくと、上述のとおり、細胞培養液の色の影響を受ける。従って、細胞内粒子に依存する側方散乱光は紫外領域の短波長側で計測することが望ましい。

[0029] 図 4 に、図 1 に示す制御部 18 の概略構成図を示す。上述のように、本実施形態では一例として、制御部 18 が細胞計測機構 16 と協働し、計測される前方散乱光強度、透過率及び側方散乱光強度に基づき、細胞懸濁液中の細胞生存率等を演算により求める機能を有する場合を示している。

[0030] 制御部 18 は、演算処理部 18 a、演算プログラム格納部 18 b、I/O インタフェース 18 c、及び校正曲線データベース (DB) を備え、これらを内部バス 18 e にて相互に接続する構成を有する。I/O インタフェース 18 c は、上述の測定部 6 を構成する、前方散乱光検出器 24 にて計測された前方散乱光強度、透過率検出器 25 にて計測された透過率、及び側方散乱光検出器 26 にて計測された側方散乱光強度を取り込み可能とすると共に、測定部 6 を構成する光源 22 へ照射光の出射指令（照射タイミング等）を送信可能とする。演算プログラム格納部 18 b には、生細胞濃度演算プログラム、死細胞濃度演算プログラム及び細胞生存率演算プログラムが格納されている。また、校正曲線データベース 18 d には、生細胞濃度 (CVc) と前方散乱光強度との関係を示す、生細胞濃度 (CVc) の演算に用いられる校正曲線 (1) が予め格納されている。死細胞濃度 (CDc) と透過率 T との関係を示す、死細胞濃度 (CDc) の演算に用いられる校正曲線 (2) も、同様に予め格納されている。また、細胞生存率と側方散乱光強度との関係を示す、細胞生存率の演算に用いられる校正曲線 (3) も予め格納されている。なお、演算プログラム格納部 18 b に格納されるプログラムとして、生細

胞濃度演算プログラム、死細胞濃度演算プログラム及び細胞生存率演算プログラムを1つのプログラムに組み込み、格納しても良い。

[0031] 演算処理部18aは、例えば、1つのCPUあるいは、複数並列接続されたCPU等のプロセッサにて実現される。演算処理部18aによる具体的処理については、実施例にて後述する。演算処理部18aは、演算プログラム格納部18bより生細胞濃度演算プログラムを読み出し、I/Oインタフェース18cより取り込まれる前方散乱光強度を、内部バス18eを介して取り込み、生細胞濃度演算プログラムを実行する。そして、校正曲線データベース18dを参照し、校正曲線(1)を用いて生細胞懸濁液中の生細胞濃度(CVc)を求める。また、演算処理部18aは、演算プログラム格納部18bより死細胞濃度演算プログラムを読み出し、I/Oインタフェース18cより取り込まれる透過率Tを、内部バス18eを介して取り込み、死細胞濃度演算プログラムを実行する。そして、校正曲線データベース18dを参照し、校正曲線(2)を用いて生細胞懸濁液中の死細胞濃度(CDc)を求める。更に、細胞懸濁液中に含まれる低活性の生細胞(Sc)が限りなく小数であって、無視し得る場合、上記生細胞濃度(CVc)及び死細胞濃度(CDc)を用いて細胞生存率を求める。

[0032] また、演算処理部18aは、上記と異なり生細胞懸濁液中に含まれる低活性の生細胞(Sc)が無視できない程度の数含まれる場合には、上記と同様に、生細胞濃度(CVcc)及び死細胞濃度(CDc)を求めた後、次の処理を実行する。演算処理部18aは、演算プログラム格納部18bより細胞生存率演算プログラムを読み出し、I/Oインタフェース18cより取り込まれる側方散乱光強度を、内部バス18eを介して取り込み、細胞生存率演算プログラムを実行する。そして、校正曲線データベース18dを参照し、校正曲線(3)を用い、更に生細胞濃度(CVc)及び死細胞濃度(CDc)に基づき細胞生存率を求める。

[0033] このように、制御部18が、測定部6により計測される前方散乱光強度、透過率T及び/又は側方散乱光強度を用いると共に、予め校正曲線データベ

ース18dに格納される校正曲線(1)~(3)を用いて、生細胞懸濁液中の細胞生存率を求めることにより、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、少なくとも細胞生存率の計測を高精度かつ迅速に実行することが可能となる。

[0034] なお、上述のとおり本実施形態の細胞培装置1は、生細胞濃度(CVc)及び死細胞濃度(CDc)を求めることから、生細胞(Vc)数及び死細胞(Dc)数を求めることも可能である。また、低活性の生細胞(Sc)については、前方散乱光検出器24より得られる前方散乱光強度及び透過率検出器25より得られる透過率Tに、所定の閾値を予め設定することで、低活性の生細胞濃度(CSc)、更には、低活性の生細胞(Sc)数を求めることも可能となる。閾値の設定については、予め既知の濃度の標準サンプルを用意し、前方散乱光強度及び透過率Tを測定することで、最適な閾値が得られる。

[0035] 以下に、予め校正曲線データベース18dに格納される校正曲線(1)~(3)について、ヒト大腸がん細胞株(Caco-2細胞)の場合を例に説明する。

<生細胞濃度(CVc)と前方散乱光強度との関係を示す、校正曲線(1)>

図5は、Caco-2細胞懸濁液中の生細胞濃度と前方散乱光強度の関係を示す図であり、校正曲線(1)の説明図である。図5に示す校正曲線(1)は、図3に示す前方散乱角度 θ が 20° とした場合のものである。

[0036] 先ず、Caco-2細胞懸濁液中に生細胞(Vc)が生細胞濃度(CVc)100%となる標準試料、更には、生細胞濃度(CVc)が異なる複数の標準試料を準備する。そして、前方散乱検出角度 θ を 20° に調整し、それぞれ生細胞濃度(CVc)の異なる標準試料をフローセル23内に通流し、前方散乱光強度を前方散乱検出器24により計測する。そして、横軸に生細胞濃度(CVc)、縦軸に計測された前方散乱光強度を取り、プロットする。プロットされた、各生細胞濃度(CVc)における前方散乱光強度の測定

値を、直線にて近似し、図5に示す校正曲線を作成し、校正曲線(1)として図4に示す校正曲線データベース18dに格納する。なお、ここでは、Caco-2細胞の生細胞(Vc)を標準試料として、複数の生細胞濃度(CVc)分用意したがこれに限られるものではない。例えば、Caco-2細胞の生細胞(Vc)と同一粒径のラテックス粒子を用意し、このラテックス粒子を標準試料として、それぞれ、異なる濃度で細胞培養液に混合し、上記と同様に、前方散乱光強度を測定することにより、校正曲線(1)を作成しても良い。

<死細胞濃度(CDc)と透過率Tとの関係を示す、校正曲線(2)>

図6は、Caco-2細胞懸濁液中の各死細胞濃度における、光源からの照射光の波長と透過率Tとの関係を示すスペクトル図である。

[0037] 先ず、Caco-2細胞を培養容器に導入し、培養容器の底面に接着することなく、細胞培養液中を浮遊する細胞を集め、攪拌後10分静置する。その後、液面付近を分取し、分取された細胞をセルカウンターにより測定し、83%が粒子径約5 μ mの死細胞(Dc)を得る。この死細胞(Dc)を用いて死細胞濃度(CDc)が $1.5 \sim 6.0 \times 10^5$ cells/mL、生細胞濃度(CVc)が 1.8×10^6 cells/mLとなるよう、細胞懸濁液標準試料を調製し、各死細胞濃度(CDc)における透過率Tスペクトルを測定した。その結果、図6に示すように、横軸に光源からの照射光の波長、縦軸に透過率Tを取り、死細胞濃度(CDc)が、0 cells/mL、 1.5×10^5 cells/mL、 3.0×10^5 cells/mL、及び 6.0×10^5 cells/mLにおけるスペクトルが得られた。

[0038] 図6のスペクトル図に示されるように、波長400nm以下の波長域、及び450~600nmの波長域では、いずれの死細胞濃度(CDc)試料でも透過率Tが大きく減少している。これは、波長400nm以下では細胞質による吸収が、また、450~600nmの波長域では、上述のようにpH指示薬の添加による細胞培養液の着色による吸収が生じるためである。この波長域以外で黒くなった細胞、すなわち、死細胞(Dc)による照射光の吸

収を測定可能な波長域として、650～750nmの最適波長域 $\Delta\lambda$ が好適である。この最適波長域 $\Delta\lambda$ 内の波長700nmにおける透過率Tを求めた結果を、以下の表1に示す。

[0039] [表1]

表 1

細胞懸濁液中の 死細胞濃度 (cells/mL)	透過率T (%, 波長700nm)
0	100.6
150000	96.5
300000	93.8
600000	89.3

[0040] 表1に示すように、生細胞懸濁液中の死細胞濃度(CDc)が0cells/mLでは透過率Tは100.6%、死細胞濃度(CDc)が 1.5×10^5 cells/mLでは透過率Tは96.5%、死細胞濃度(CDc)が 3.0×10^5 cells/mLでは透過率Tは93.8%、死細胞濃度(CDc)が 6.0×10^5 cells/mLでは透過率Tは89.3%が得られた。これより、死細胞濃度(CDc)が0cells/mLの試料(細胞培養液等)をフローセル23に通流し、透過率検出器25により透過率Tを予め測定し、その測定値をベースラインとして記憶部(図示せず)に格納することで、照射光波長700nmにおいて、各生細胞懸濁液中の死細胞濃度(CDc)における透過率Tの計測値とベースラインとの差分を得ることで、生細胞懸濁液中の死細胞(Dc)による透過率Tの減少を出力することが可能となる。

[0041] 図7に、Caco-2培地中の死細胞濃度(CDc)と透過率Tの関係を示す。また、図8に、Caco-2生細胞懸濁液中の死細胞濃度(CDc)と透過率Tの関係を示す。図7及び図8のいずれにおいても、上記のとおり、照射光の波長を700nmとし、死細胞濃度(CDc)が0cells/mL

の標準試料の透過率 T をベースラインとし、各死細胞濃度 (CDc) の標準試料の透過率 T との差分を求め、校正曲線を作成した。培地中の校正曲線及び生細胞懸濁液中の校正曲線の傾きは同一であり、生細胞懸濁液に影響されることなく、黒い死細胞 (Dc) の個数が増加することに伴い透過率 T が減衰することが確認された。これにより、図8に示す死細胞濃度 (CDc) と透過率 T との関係を示す、校正曲線を、校正曲線 (2) として図4に示す校正曲線データベース18dに格納する。なお、ここでは、Caco-2細胞の死細胞 (Dc) を標準試料として、複数の死細胞濃度 (CDc) 分用意したがこれに限られるものではない。例えば、Caco-2細胞の死細胞 (Dc) と同一粒径の黒色粒子を用意し、この黒色粒子を標準試料として、それぞれ、異なる濃度で細胞培養液に混合し、上記と同様に、透過率 T を測定することにより、校正曲線 (2) を作成しても良い。ここで、黒色粒子として、例えば、磁性粒子やカーボンブラック等が使用できる。

<細胞生存率と側方散乱光強度との関係を示す、校正曲線 (3) >

図9は、Caco-2細胞懸濁液中の細胞培養液及び各細胞生存率における、光源からの照射光の波長と側方散乱光強度との関係を示すスペクトル図である。

[0042] 先ず、生細胞懸濁液標準試料として、細胞生存率0%、すなわち細胞培養液のみ (ブランク: blank) の標準試料、細胞生存率25%、細胞生存率40%、細胞生存率70%となるよう細胞懸濁液標準試料を調整する。そして、こら各細胞生存率の細胞懸濁液標準試料をフローセル23内に通流し、側方散乱光検出強度を側方散乱光検出器26により測定する。その結果、図9に示すように、横軸に光源からの照射光の波長、縦軸に側方散乱光強度を取り、細胞生存率が、0% (細胞培養液のみ)、25%、40%、70%におけるスペクトルが得られた。

[0043] 図9の側方散乱光スペクトル図に示されるように、紫外領域 (230nm ~ 310nm付近) では、細胞生存率毎に、照射光の波長に対する側方散乱光強度に相違が生じる。しかし、紫外領域外では、細胞生存率毎の側方散乱

光強度に相違は生じず、これでは各細胞生存率を識別することができない。これは、上述のとおり可視光領域の波長に近づくと、細胞培養液の色の影響を受けるためである。従って、細胞内粒子に依存する側方散乱光は紫外領域の短波長側で計測することが好ましい。波長280nmにおける側方散乱光強度の測定結果を、以下の表2に示す。

[0044] [表2]

表 2

細胞懸濁液中の細胞生存率(%)	検体No.	側方散乱光強度(280nm, count)
0	1	17.48
25	1	19.76
40	1	24.31
70	1	32.85
70	2	32.33
70	3	32.14

[0045] 表2に示すように、生細胞懸濁液中の細胞生存率が0%では側方散乱光強度は17.48、細胞生存率が25%では側方散乱光強度は19.76、細胞生存率が40%では側方散乱光強度は24.31、細胞生存率が70%では側方散乱光強度は32.85%が得られた。これにより、細胞培養液のみ（細胞生存率：0%）をフローセル23に通流し、側方散乱光検出器26により側方散乱光強度を予め測定し、その測定値をベースラインとして記憶部（図示せず）に格納する。そして、照射光波長280nmにおいて、各生細胞懸濁液中の細胞生存率における側方散乱光強度とベースラインとの差分を得ることで、生細胞懸濁液中の細胞生存率の増加分を出力することが可能となる。なお、必ずしもベースラインに対する差分（増加分）を出力する構成に限らず、側方散乱光検出器26により測定された側方散乱光強度そのものを出力する構成としても良い。

[0046] 図10に、Caco-2生細胞懸濁液中の細胞生存率と側方散乱光強度の

関係を示す。上記のとおり、照射光の波長を280nmとし、細胞生存率が0%（細胞培養液のみ）の標準試料の側方散乱光強度をベースラインとし、各細胞生存率の標準試料の側方散乱光強度との差分を求め、校正曲線を作成し、校正曲線（3）として図4に示す校正曲線データベース18dに格納する。なお、図10に示すように、側方散乱光強度は細胞生存率に比例することが確認できる。

[0047] 以上のとおり、本実施形態の細胞計測機構16及び細胞培養装置1によれば、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、少なくとも細胞生存率の計測を高精度かつ迅速に実行することが可能となる。

[0048] また、細胞生存率の他、生細胞濃度（CVc）、死細胞濃度（CDc）、生細胞（Vc）数及び死細胞（Dc）数を求めることも可能である。また、更には、低活性の生細胞（Sc）についても同様に、低活性の生細胞濃度（CSc）及び、低活性の生細胞（Sc）数を求めることも可能となる。

[0049] 以下、図面を用いて本発明の実施例について説明する。

実施例 1

[0050] 本実施例の細胞培養装置1は、上述の図1に示す構成と同様であり、細胞計測機構16を構成する測定部6は、上述の図3に示す構成と同様であり、また、制御部18の構成は、上述の図4に示す構成と同様であり、重複する説明は省略する。なお、以下では、制御部18が、細胞計測機構16と協働し、計測される前方散乱光強度、透過率及び側方散乱光強度に基づき、細胞懸濁液中の細胞生存率等を演算により求める機能を有する場合を一例として説明するが、これ限らず、例えば、細胞計測機構16内に上記機能を有する制御演算部を設けても良く、また、後述する測定部6に制御演算部を配する構成としても良い。

[0051] また、以下では、培養細胞として、ヒト大腸がん細胞株（Caco-2細胞）を例に、図3に示す光源22の光軸とのなす角、すなわち前方散乱検出角度 θ を 20° に予め調整し測定する場合を例に説明する。なお、上述のと

おり、前方散乱検出角度 θ は、細胞種の生細胞（ V_c ）の粒子径に依存する。 $Caco-2$ 細胞以外の他の細胞腫の測定に最適な前方散乱検出角度 θ は、約 $5^\circ \sim 45^\circ$ の範囲内で調整可能である。

[0052] 図11に、本実施例の細胞計測機構16による細胞生存率算出処理のフローチャートを示す。先ず、図4に示す演算処理部18aは、演算プログラム格納部18bより、生細胞濃度演算プログラム及び死細胞濃度演算プログラムを、内部バス18eを介して読み出す（ステップS101）。

[0053] ステップS102では、演算処理部18aは、測定部6を構成する前方散乱光検出器24により測定された前方散乱光検出強度を、I/Oインタフェース18c及び内部バス18eを介して取り込む。ここで、取り込まれる前方散乱光検出強度は、拡大培養機構15にて培養し増殖され、剥離後の $Caco-2$ 細胞を含む生細胞懸濁液がフローセル23内に通流され、光源22からの照射光により前方へ散乱する前方散乱光の強度である。

[0054] ステップS103では、演算処理部18aは、校正曲線データベース18dにアクセスし、図5に示す $Caco-2$ 細胞懸濁液中の生細胞濃度（ CV_c ）と前方散乱光強度との関係を示す校正曲線（1）を参照する。演算処理部18aは、測定された前方散乱光強度に対応する生細胞濃度（ CV_c ）を、この校正曲線（1）を用いて抽出することで、生細胞濃度（ CV_c ）の算出を行う（ステップS104）。

[0055] 次にステップS105では、演算処理部18aは、測定部6を構成する透過率検出器25により測定された透過率 T を、I/Oインタフェース18c及び内部バス18eを介して取り込む。そして、再び演算処理部18aは、校正曲線データベース18dにアクセスし、図8に示す $Caco-2$ 細胞懸濁液中の死細胞濃度（ CD_c ）と透過率 T との関係を示す校正曲線（2）を参照する（ステップS106）。演算処理部18aは、測定された透過率 T に対応する死細胞濃度（ CD_c ）を、この校正曲線（2）を用いて抽出することで、死細胞濃度（ CD_c ）の算出を行う（ステップS107）。なお、前方散乱光強度は相対的な信号であるのに対し、透過率 T は絶対値として扱

うことができる信号である。これは、上述した校正曲線（２）の作成時と同様に、測定時においても、予め細胞培養液のみ（細胞生存率０％と同等）をフローセル２３に通流し、その時に測定される透過率Ｔをベースラインとして記憶する。そして、生細胞懸濁液をフローセル２３へ通流した時に得られる透過率Ｔとベースラインとの差分、すなわち透過率Ｔの減少を出力する構成としていることによる。換言すれば、透過率検出器２４より得られる透過率Ｔは、レファレンス光によるバックグラウンド補正（バックグラウンドのノイズ除去）後の信号であることによる。

[0056] ステップＳ１０８では、演算処理部１８ａは、ステップＳ１０４にて得られた生細胞濃度（ C_{Vc} ）及びステップＳ１０７で得られた死細胞濃度（ C_{Dc} ）を用いて、 $(C_{Vc} / (C_{Vc} + C_{Dc}))$ を算出し、 $Caco-2$ 細胞懸濁液中の細胞生存率を求める。

[0057] なお、本実施例では、培養細胞である $Caco-2$ 細胞は、せん断力（シヤラストレス）に強く、細胞生存率を高く維持することが容易であり、且つ、せん断力による活性低下の影響が少ない細胞であるため、 $Caco-2$ 細胞懸濁液中における生細胞濃度（ C_{Vc} ）、死細胞濃度（ C_{Dc} ）及び低活性の生細胞濃度（ C_{Sc} ）が以下の関係にあると想定できるからである。

[0058] 低活性の生細胞濃度（ C_{Sc} ） \ll （ $C_{Vc} + C_{Sc} + C_{Dc}$ ）
 $C_{Dc} \doteq (C_{Sc} + C_{Dc})$

以上のとおり、本実施例では、生細胞懸濁液に光源より照射光を照射することにより得られる、前方散乱光検出強度及び透過率に基づき、生細胞懸濁液に未知の濃度で含まれる生細胞、すなわち細胞生存率を得ることができる。なお、細胞生存率の他、生細胞濃度（ C_{Vc} ）、死細胞濃度（ C_{Dc} ）、生細胞（ Vc ）数及び死細胞（ Dc ）数も得ることができる。

[0059] 本実施例によれば、作業者の熟練度に依ることなく、また、培養細胞を染色することなく、少なくとも細胞生存率の計測を高精度かつ迅速に実行することが可能となる。

[0060] また、本実施例によれば、ベースライン補正後の透過光を得る構成である

ことから、簡易な測定部の構成により、ダブルビーム分光光度計と同様の計測精度を得ることができる。

実施例 2

- [0061] 図 12 に、本発明の他の実施例である実施例 2 の細胞生存率算出フローチャートを示す。本実施例では、細胞生存率の算出に、測定部 6 を構成する側方散乱光検出器 26 により測定される側方散乱光強度を用いる点が実施例 1 と異なる。以下では、実施例 1 と同様の構成については説明を省略する。
- [0062] 図 12 に示すように、ステップ S 101 では、演算処理部 18a は、演算プログラム格納部 18b より、生細胞濃度演算プログラム及び死細胞濃度演算プログラムに加え、更に、細胞生存率演算プログラムを、内部バス 18e を介して読み出す。その後のステップ S 102 ~ ステップ S 107 までは実施例 1 と同様に実行される。
- [0063] ステップ S 107 にて死細胞濃度 (CDc) 算出後、演算処理部 18a は、測定部 6 を構成する側方散乱光検出器 26 により測定された側方散乱光強度を、I/O インタフェース 18c 及び内部バス 18e を介して取り込む (ステップ S 109)。
- [0064] ステップ S 110 では、演算処理部 18a は、校正曲線データベース 18d にアクセスし、図 10 に示す Caco-2 細胞懸濁液中の細胞生存率と側方散乱光強度との関係を示す校正曲線 (3) を参照する。
- [0065] ステップ S 111 では、演算処理部 18a は、ステップ S 104 にて得られた生細胞濃度 (CVc) 及びステップ S 107 にて得られた死細胞濃度 (CDc) を用いて、参照した校正曲線 (3) の y 切片を補正する。具体的には、予め実試料の細胞種 (ここでは、Caco-2 細胞) を用い、細胞生存率約 100% の細胞懸濁液を用意する。そして、この細胞懸濁液中の生細胞濃度 (CVc) 及び側方散乱光強度との関係を、前方散乱光検出器 24 及び側方散乱光検出器 26 により測定し求めておく。なお、細胞生存率約 100% の細胞懸濁液は、遠心分離操作により懸濁液中のごみや小さな死細胞を除去することにより得ることができる。しかし再生医療や細胞治療に使用され

る検体や、株化されていない初代培養細胞等、細胞種によっては、細胞剥離操作や遠心分離操作の過程でダメージを受け細胞活性が低下しやすく、細胞生存率約100%を維持できないものもある。この場合は細胞剥離や遠心分離操作で得られる細胞懸濁液の平均的な最大細胞生存率を求めておく。例えば、ヒト口腔粘膜上皮細胞では最大細胞生存率は85～90%程度である。最大細胞生存率における生細胞濃度（CVc）と側方散乱光強度の関係を求め、記憶部に格納する。この最大細胞生存率における生細胞濃度（CVc）と側方散乱光強度との関係を用い、ステップS104及びステップS107にて得られた生細胞濃度（CVc）及び死細胞濃度（CDc）から、最大細胞生存率における側方散乱光強度を求める。この求めた側方散乱光強度の値を用いて、校正曲線（3）のy切片を補正する。

[0066] 次に、ステップS112では、演算処理部18aは、測定された側方散乱光強度に対応する細胞生存率を、補正後の校正曲線（3）を用いて抽出することで、細胞生存率の算出を行う（ステップS112）。なお、ステップS111にてy切片が補正された校正曲線（3）を、校正曲線データベース18dに既に格納されている校正曲線（3）に替えて格納する。すなわち、補正後の校正曲線（3）に更新し格納する。

[0067] 本実施例においても、実施例1と同様に、培養細胞であるCaco-2細胞は、せん断力（シェアストレス）に強く、細胞生存率を高く維持することが容易であり、且つ、せん断力による活性低下の影響が少ない細胞であるため、Caco-2細胞懸濁液中における生細胞濃度（CVc）、死細胞濃度（CDc）及び低活性の生細胞濃度（CSc）が以下の関係にあると想定している。

[0068] 低活性の生細胞濃度（CSc） \ll （CVc+CSc+CDc）

$$CDc \doteq (CSc + CDc)$$

本実施例によれば、実施例1の効果に加え、校正曲線（3）を補正し細胞生存率を算出することにより、更に細胞生存率を高精度に計測することが可能となる。

実施例 3

[0069] 図13に、本発明の他の実施例である実施例3の細胞生存率算出フローチャートを示す。実施例1及び実施例2では、生細胞懸濁液中の低活性の生細胞濃度(CSc)が無視できるほど低い場合、すなわち、 $CDc \div (CSc + CDc)$ と想定できる場合について説明した。本実施例では、 $CDc \div (CSc + CDc)$ と想定できない場合における生細胞懸濁液中の細胞生存率を算出する点が、実施例1及び実施例2と異なる。以下では、実施例1及び実施例2と同様の構成については説明を省略する。

[0070] 一般的に生細胞懸濁液試料中の低活性の生細胞(Sc)の粒子径は、生細胞(Vc)の粒子径より小さく、死細胞(Dc)の粒子径より大きい。そのため、仮に、低活性の生細胞(Sc)の粒子径が死細胞(Dc)の粒子径とほぼ同一であっても、生細胞濃度(CVc)を算出するために用いられる校正曲線(1)に対し影響を及ぼすことは無い。しかし、仮に、生細胞(Vc)の粒子径に近い大きさの低活性の生細胞(Sc)が、生細胞懸濁液中に多数存在する場合は、校正曲線(1)の傾きに影響を及ぼすことになる。

[0071] 図13に示すように、演算処理部18aは、ステップS101～ステップS107まで、上述の実施例1と同様に実行する。その後、演算処理部18aは、ステップS104にて得られた生細胞濃度(CVc)及びステップS107にて得られた死細胞濃度(CDc)により、低活性の生細胞濃度(CSc)及び全細胞数、すなわち、生細胞(Vc)数+死細胞(Dc)数+低活性の生細胞(Sc)数を算出する(ステップS201)。

[0072] ステップS202では、演算処理部18aは、以下を算出する(ステップS202)。

$$\left((CVc + CSc + CDc) - CDc \right) / (CVc + CSc + CDc)$$

そして、上記算出結果と、 $CVc / (CVc + CDc)$ (図11に示すステップS108と同様)とを比較する。比較結果が大きく異なることで、生細胞(Vc)の粒子径に近い大きさの低活性の生細胞(Sc)が、生細胞懸濁液中に多数存在することが判明する。また、ステップS104にて、校正曲

線（１）を用いて算出された生細胞濃度（ $C V c$ ）が正常な値でないことがわかる。そこで校正曲線（１）を補正するための処理に移行する。

[0073] 先ず、ステップS 2 0 3にて、生細胞懸濁液を一定時間（ Δt ）放置する。この Δt の期間において、低活性の生細胞（ $S c$ ）の一部は死細胞（ $D c$ ）となり、低活性の生細胞（ $S c$ ）数は、 Δt 放置前の時刻 t_A における個数から、 Δt 経過後の時刻 t_B における個数へと減少する。また、死細胞（ $D c$ ）数は、 Δt 放置前の時刻 t_A における個数から、 Δt 経過後の時刻 t_B における個数へと増加する。

[0074] ステップS 2 0 4では、演算処理部 1 8 aは、側方散乱光強度から得られる細胞生存率を x 軸、透過率 T より得られる細胞生存率を y 軸とし、時刻 t_A 及び時刻 t_B における各細胞生存率をプロットする。これらプロットされた2点間を結ぶ直線の傾きは、仮に、低活性の生細胞濃度（ $C S c$ ）が“0”の場合、直線の傾きは“1”となる。しかし、実際の直線の傾きは“1”から乖離する。従って、低活性の生細胞（ $S c$ ）により生じるこの乖離、すなわち直線の傾きの差分を偏差として算出する。

[0075] ステップS 2 0 5では、演算処理部 1 8 aは、ステップS 2 0 4で求めた偏差を用いて、校正曲線データベース 1 8 dに格納される校正曲線（１）を補正し、補正後の校正曲線（１）を用いて、測定された前方散乱光強度に対応する生細胞濃度（ $C V c$ ）を再度抽出することで、生細胞濃度（ $C V c$ ）を算出する。なお、ステップS 2 0 5にて補正された校正曲線（１）を、校正曲線データベース 1 8 dに既に格納されている校正曲線（１）に替えて格納する。すなわち、補正後の校正曲線（１）に更新し格納する。

[0076] ステップS 2 0 6では、ステップS 2 0 5にて算出された生細胞濃度（ $C V c$ ）及びステップS 1 0 7にて得られた死細胞濃度（ $C D c$ ）に基づき、以下にて細胞生存率を算出する

$$(C V c + C S c) / (C V c + C S c + C D c)$$

本実施例によれば、実施例 1 の効果に加え、生細胞懸濁液中に低活性の生細胞（ $S c$ ）が多数存在する場合においても、細胞生存率を高精度に求める

ことが可能となる。

[0077] なお、本実施例のステップS205に替えて、ステップS204にて得られる偏差に基づき、前方散乱検出角度 θ を変更し、校正曲線データベース18dに格納される校正曲線(1)の傾きと一致するよう、前方散乱光検出器24の配置位置を調整する構成としても良い。

[0078] また、予め、生細胞(Vc)の粒子径より小さなラテックス粒子を用意し、このラテックス粒子を疑似的な低活性の生細胞(Sc)として、校正曲線(1)の作成時に用いた標準試料に添加する。そして、校正曲線データベース18dに格納される校正曲線(1)である、生細胞濃度(CVc)と前方散乱光強度との関係に及ぼす影響を求める。そして、濃度の異なるラテックス粒子を標準試料に添加した時の校正曲線を作成し、新たに校正曲線データベース18dに格納することで、生細胞懸濁液中に低活性の生細胞(Sc)が多数存在する場合において、生細胞濃度(CVc)の算出に用いる校正曲線としても良い。この場合、使用するラテックス粒子の粒子径は、生細胞(Vc)の粒子径の±数 μm とするのが望ましく、最低でも1種類以上の粒子径のラテックス粒子を用いることが望ましい。

[0079] 実施例1から実施例3では、培養細胞の一例として、Caco-2細胞を示したが、他の細胞種、例えば、NIH/3T3細胞、ヒト口腔粘膜上皮細胞、ヒト骨格筋筋芽細胞、ヒト間葉系幹細胞、又はヒト軟骨細胞等、各種細胞を培養する場合においても同様に適用できる。

[0080] なお、本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上記した実施例は本発明を分かりやすく説明するために詳細に説明したものであり、必ずしも説明した全ての構成を備えるものに限定されるものではない。また、ある実施例の構成の一部を他の実施例の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることも可能である。また、各実施例の構成の一部について、他の実施例の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

符号の説明

[0081] 1…細胞培養装置, 2…拡大培養容器, 3…培養液供給部, 4…試料導入部, 5…分散部, 6…測定部, 7…しごきポンプ, 8…三方バルブ, 9…細胞播種試料調製部, 10…細胞供給部, 11…細胞洗浄溶液供給部, 12…細胞剥離溶液供給部, 13…細胞剥離溶液阻害剤供給部, 14…廃液, 15…拡大培養機構, 16…細胞計測機構, 17…細胞播種機構, 18…制御部, 18a…演算処理部, 18b…演算プログラム格納部, 18c…I/Oインタフェース, 18d…校正曲線データベース(DB), 18e…内部バス, 19…生細胞, 20…低活性生細胞, 21…死細胞, 22…光源, 23…フローセル, 24…前方散乱光検出器, 25…透過率検出器, 26…側方散乱光検出器

請求の範囲

- [請求項1] 細胞懸濁液を通流させる流路と、
前記流路内の細胞懸濁液を送液する液体駆動部と、
前記流路内で流動中の細胞懸濁液に光源より照射光を照射し、得られる前方散乱光強度並びに透過率及び／又は側方散乱光強度に基づき、少なくとも前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求める演算部を有することを特徴とする細胞計測機構。
- [請求項2] 請求項1に記載の細胞計測機構において、
前記演算部は、
生細胞濃度と前記前方散乱光強度との関係を示す第1の校正曲線と、
死細胞濃度と前記透過率との関係を示す第2の校正曲線と、
細胞生存率と前記側方散乱光強度との関係を示す第3の校正曲線と、
を予め格納する校正曲線データベースを有することを特徴とする細胞計測機構。
- [請求項3] 請求項2に記載の細胞計測機構において、
前記細胞懸濁液を通流するフローセルと、
前記フローセルを通流する細胞懸濁液の流れの方向に対し直交するよう配される光源と、
前記フローセルを挟み前記光源と対向し、前記光源からの照射光の光軸上に配される透過率検出器と、
前記透過率検出器側であって、前記照射光の光軸に対し前記生細胞の粒子径に応じて所定の角度をもって配される前方散乱光検出器と、
前記細胞懸濁液の流れの方向及び前記照射光の光軸の双方と直交するよう配される側方散乱光検出器と、
を有する測定部を備えることを特徴とする細胞計測機構。
- [請求項4] 請求項3に記載の細胞計測機構において、
前記演算部は、
前記前方散乱光検出器により測定される前方散乱光強度及び前記第

1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度を求め、

前記透過率検出器により測定される透過率及び前記第2の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の死細胞濃度を求め、

前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求めることを特徴とする細胞計測機構。

[請求項5]

請求項3に記載の細胞計測機構において、

前記前方散乱光検出器は、前記照射光の光軸に対し約 5° ～ 45° の角度範囲内に配され、

前記演算部は、前記前方散乱光検出器により測定される前方散乱光強度及び前記第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度又は生細胞数を求めることを特徴とする細胞計測機構。

[請求項6]

請求項3に記載の細胞計測機構において、

細胞培養液のみを前記フローセルに通流したときに測定される透過率を予めベースラインとして格納し、培養細胞が前記細胞培養液に含まれる前記細胞懸濁液を前記フローセルに通流したときに測定される透過率を、前記ベースラインとの差分として出力することを特徴とする細胞計測機構。

[請求項7]

請求項3に記載の細胞計測機構において、

前記演算部は、

前記前方散乱光検出器により測定される前方散乱光強度及び前記第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度を求め、

前記透過率検出器により測定される透過率及び前記第2の校正曲線に基づき、前記死細胞濃度を求め、

前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、前記第3の校正曲線を補正し、

補正後の第3の校正曲線及び前記側方散乱光検出器により測定される側方散乱光強度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求めることを特徴とする細胞計測機構。

- [請求項8] 細胞を培養し増殖させ、増殖させた細胞を剥離する拡大培養機構と、
、
前記拡大培養機構により剥離された細胞を含む細胞懸濁液を通流させる流路と、
前記流路内の細胞懸濁液を送液する液体駆動部と、
前記流路内で流動中の細胞懸濁液に光源より照射光を照射し、得られる前方散乱光強度並びに透過率及び／又は側方散乱光強度に基づき、少なくとも前記細胞懸濁液中の細胞生存率を算出する演算部を有する細胞計測機構と、を備えることを特徴とする細胞培養装置。
- [請求項9] 請求項8に記載の細胞培養装置において、
前記演算部は、生細胞濃度と前記前方散乱光強度との関係を示す第1の校正曲線と、死細胞濃度と前記透過率との関係を示す第2の校正曲線と、細胞生存率と前記側方散乱光強度との関係を示す第3の校正曲線と、を予め格納する校正曲線データベースを有することを特徴とする細胞培養装置。
- [請求項10] 請求項9に記載の細胞培養装置において、
前記細胞計測機構は、
前記細胞懸濁液を通流するフローセルと、
前記フローセルを通流する細胞懸濁液の流れの方向に対し直交するよう配される光源と、
前記フローセルを挟み前記光源と対向し、前記光源からの照射光の光軸上に配される透過率検出器と、
前記透過率検出器側であって、前記照射光の光軸に対し前記生細胞の粒子径に応じて所定の角度をもって配される前方散乱光検出器と、
前記細胞懸濁液の流れの方向及び前記照射光の光軸の双方と直交するよう配される側方散乱光検出器と、を有する測定部を備えることを特徴とする細胞培養装置。
- [請求項11] 請求項10に記載の細胞培養装置において、

前記前方散乱光検出器は、前記照射光の光軸に対し約 5° ～ 45° の角度範囲内に配され、

前記演算部は、前記前方散乱光検出器により測定される前方散乱光強度及び前記第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度又は生細胞数を求めることを特徴とする細胞培養装置。

[請求項12]

請求項10に記載の細胞培養装置において、

細胞培養液のみを前記フローセルに通流したときに測定される透過率を予めベースラインとして格納し、培養細胞が前記細胞培養液に含まれる前記細胞懸濁液を前記フローセルに通流したときに測定される透過率を、前記ベースラインとの差分として出力することを特徴とする細胞培養装置。

[請求項13]

請求項10に記載の細胞培養装置において、

前記演算部は、

前記前方散乱光検出器により測定される前方散乱光強度及び前記第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度を求め、

前記透過率検出器により測定される透過率及び前記第2の校正曲線に基づき、前記死細胞濃度を求め、

前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、前記第3の校正曲線を補正し、

補正後の第3の校正曲線及び前記側方散乱光検出器により測定される側方散乱光強度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求めることを特徴とする細胞培養装置。

[請求項14]

細胞懸濁液中の少なくとも細胞生存率を求める細胞計測方法であって、

フローセル内を通流する細胞懸濁液に対し、前記細胞懸濁液の流れに直交する方向より光源から照射光を照射する工程と、

前記細胞懸濁液より散乱する前方散乱光強度を測定する工程と、

前記細胞懸濁液を透過する前記照射光の透過率を測定する工程と、

前記測定された前方散乱光強度及び予め記憶された生細胞濃度と前記前方散乱光強度との関係を示す第1の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の生細胞濃度を求める工程と、

前記測定された前記透過率及び予め記憶された死細胞濃度と前記透過率との関係を示す第2の校正曲線に基づき、前記細胞懸濁液中の死細胞濃度を求める工程と、

前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求める工程と、を有することを特徴とする細胞計測方法。

[請求項15]

請求項14に記載の細胞計測方法において、

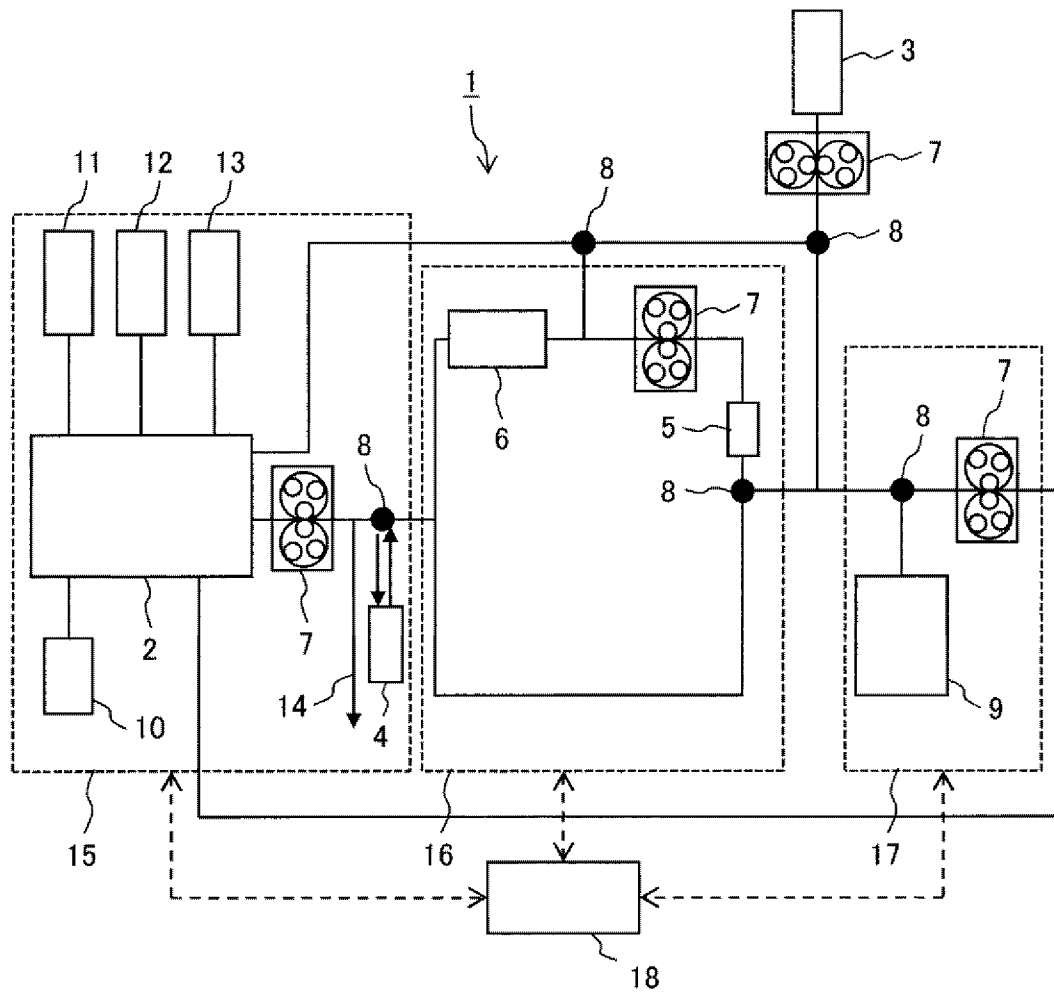
前記細胞懸濁液より、前記照射光の光軸及び前記細胞懸濁液の流れの方向に直交する方向へ散乱する側方散乱光強度を測定する工程と、

前記求めた生細胞濃度及び死細胞濃度に基づき、予め記憶された細胞生存率と前記側方散乱光強度との関係を示す第3の校正曲線を補正する工程と、

前記補正された第3の校正曲線及び前記側方散乱光強度に基づき、前記細胞懸濁液中の細胞生存率を求める工程と、を更に備えることを特徴とする細胞計測方法。

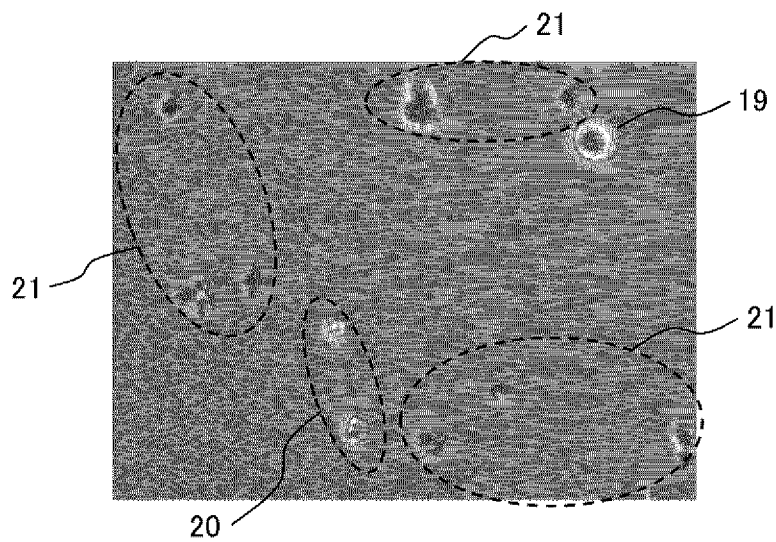
[図1]

図 1



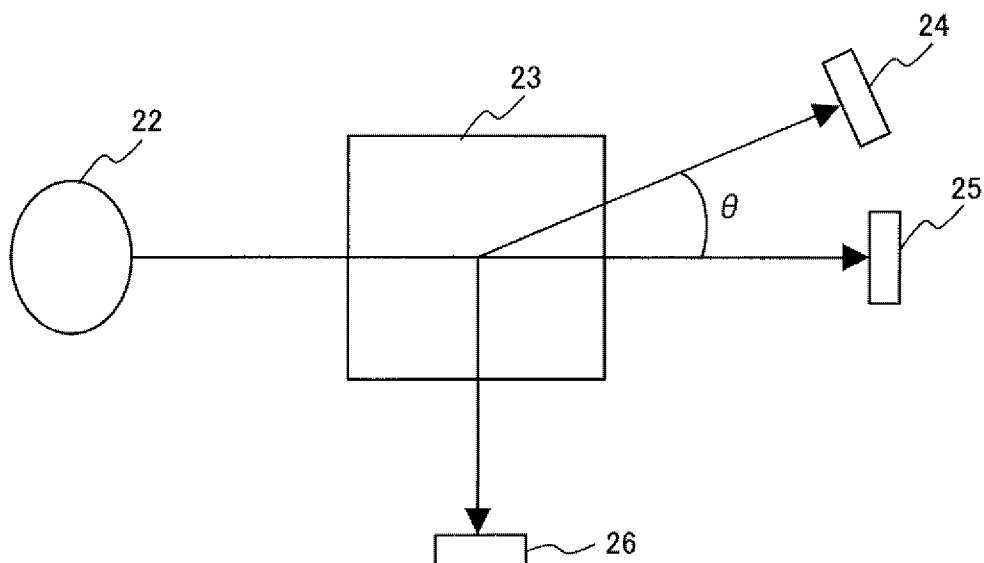
[図2]

図 2



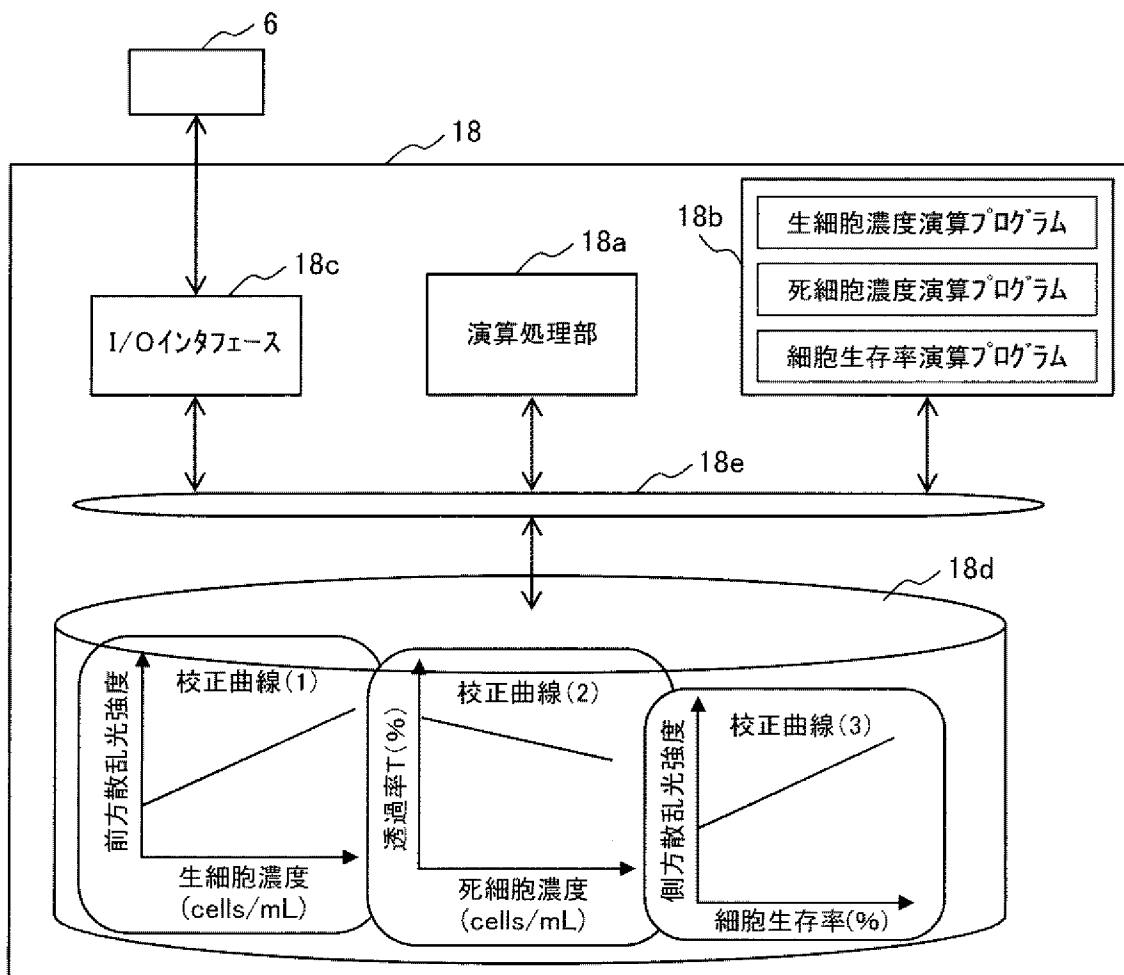
[図3]

図 3



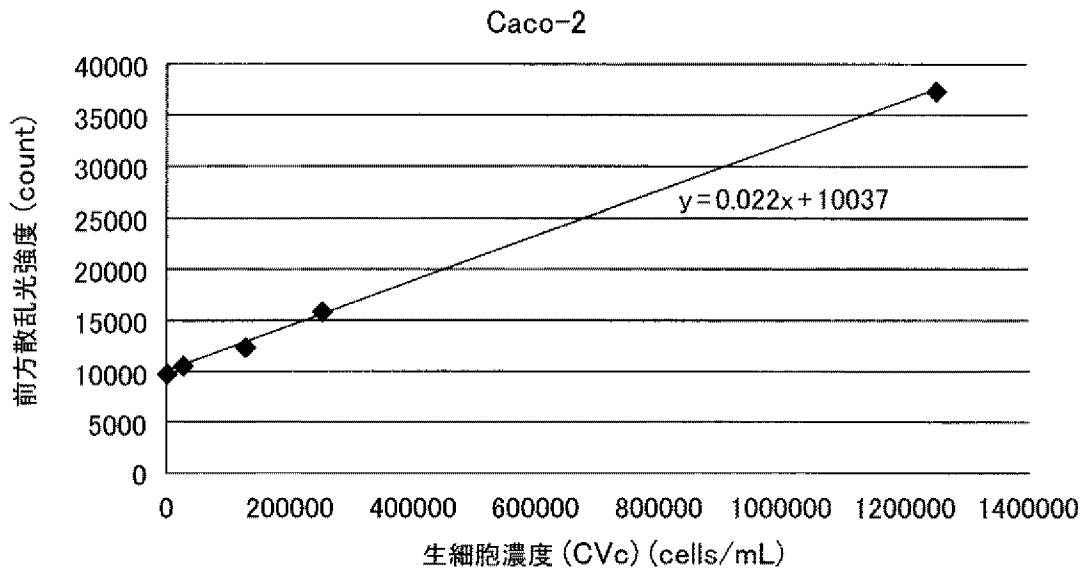
[図4]

図 4



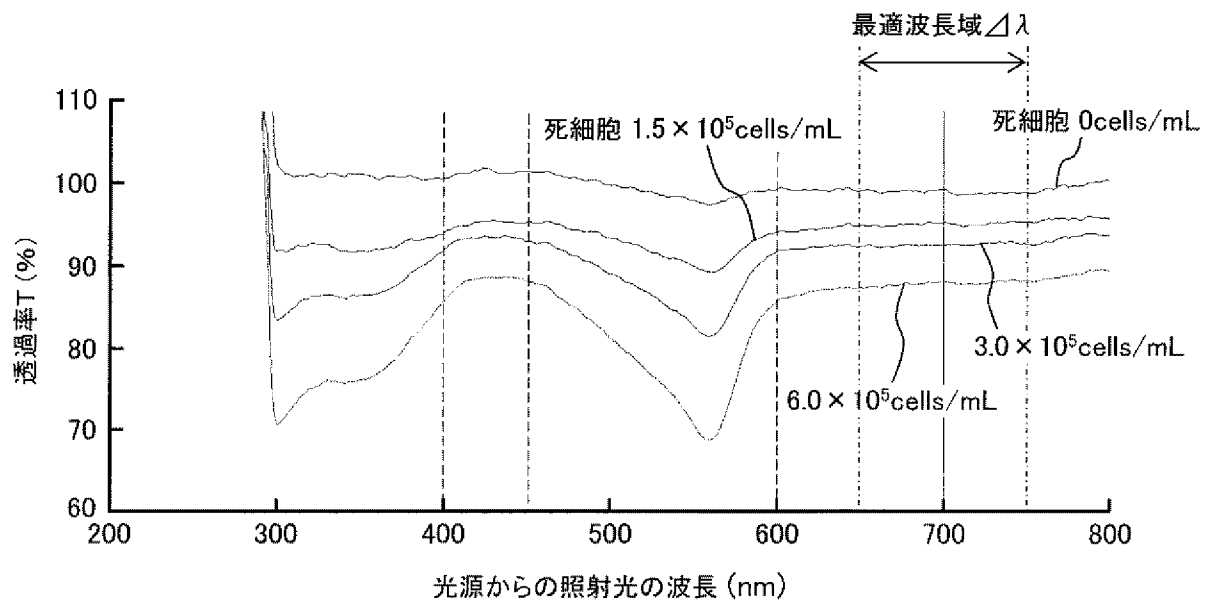
[図5]

図 5



[図6]

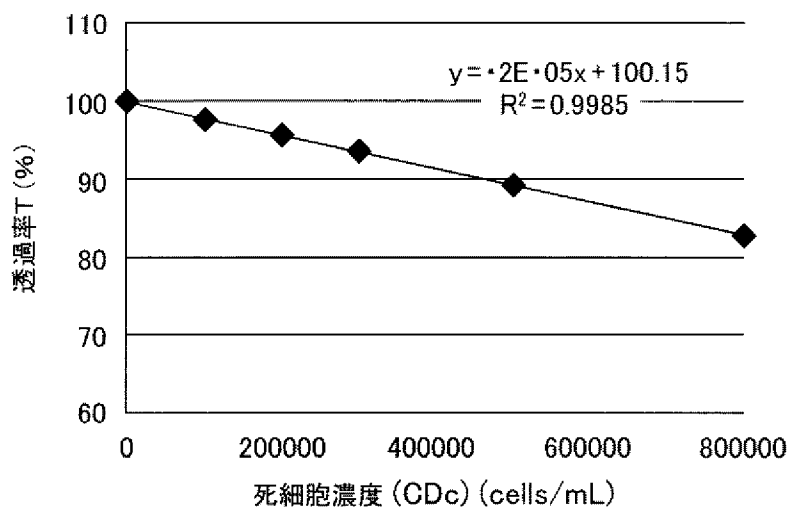
図 6



[図7]

図 7

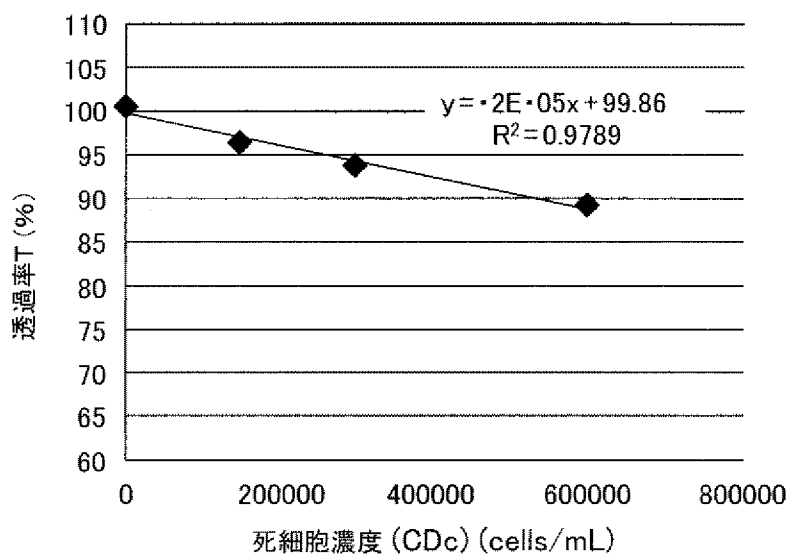
(培地中)



[図8]

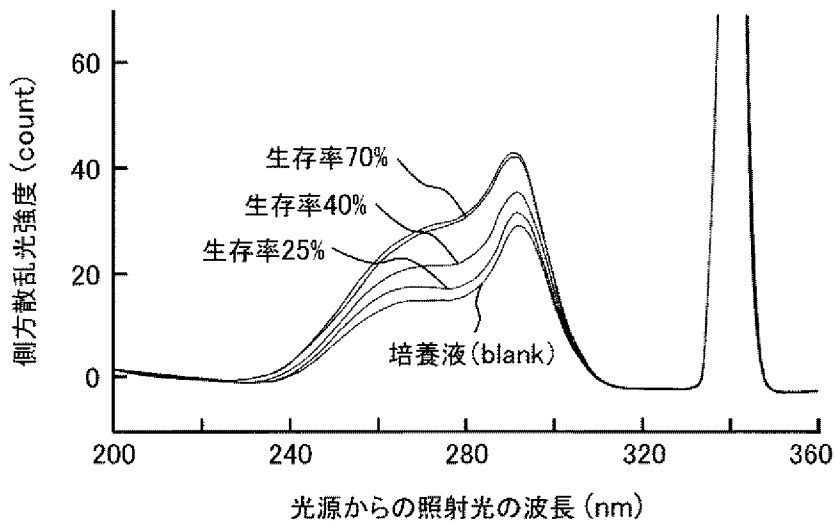
図 8

(生細胞懸濁液中)



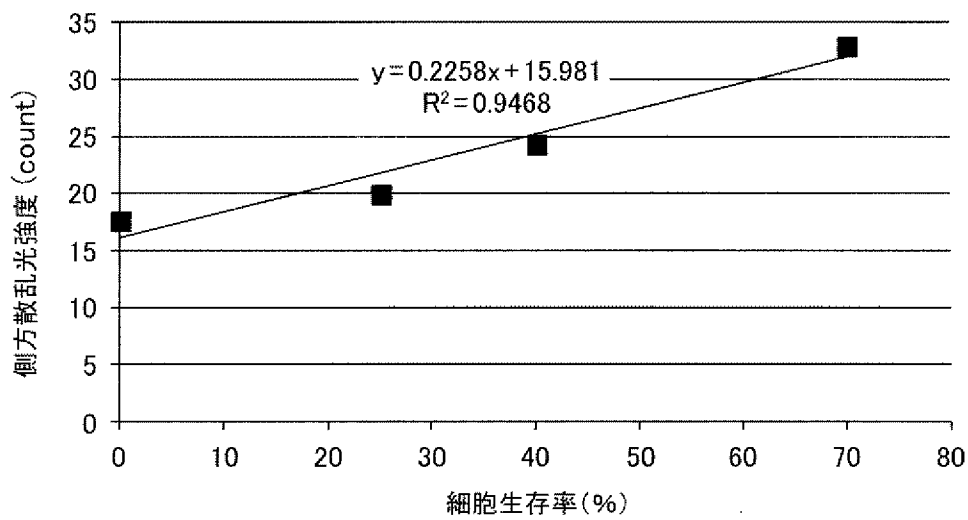
[図9]

図 9



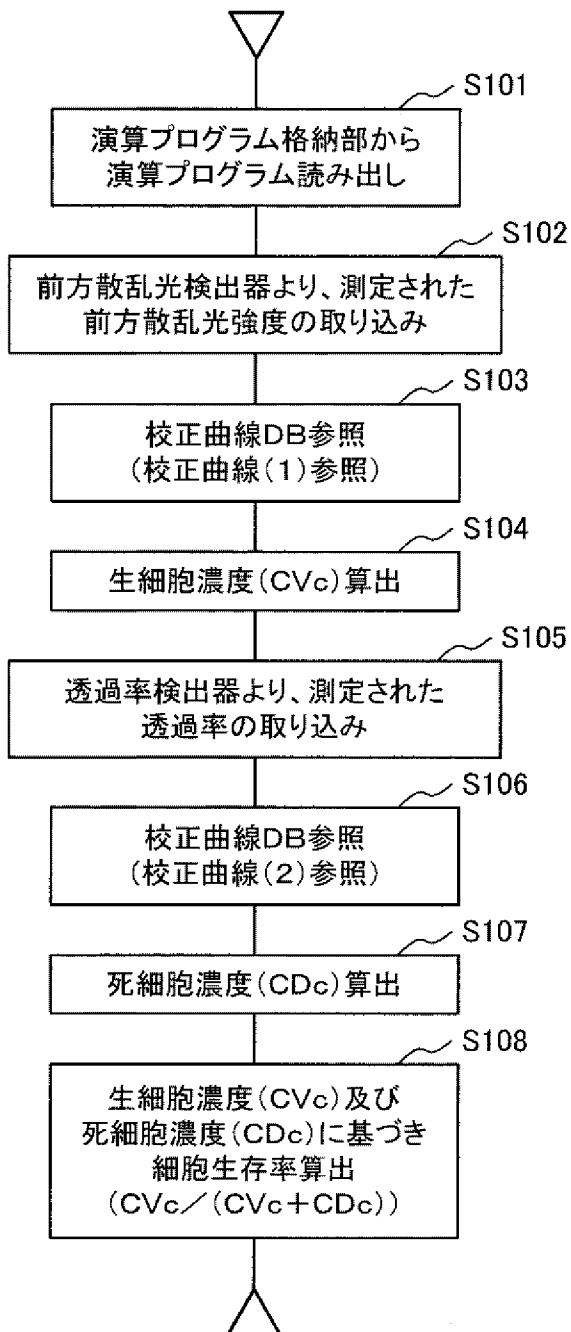
[図10]

図 10



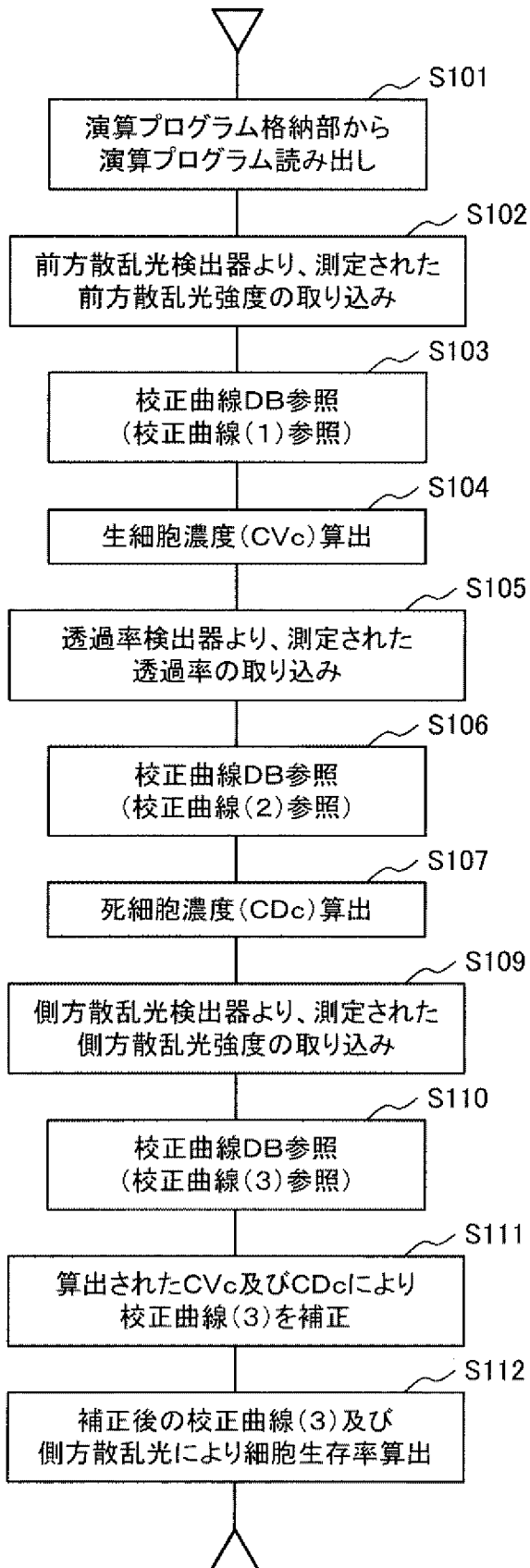
[図11]

図 11



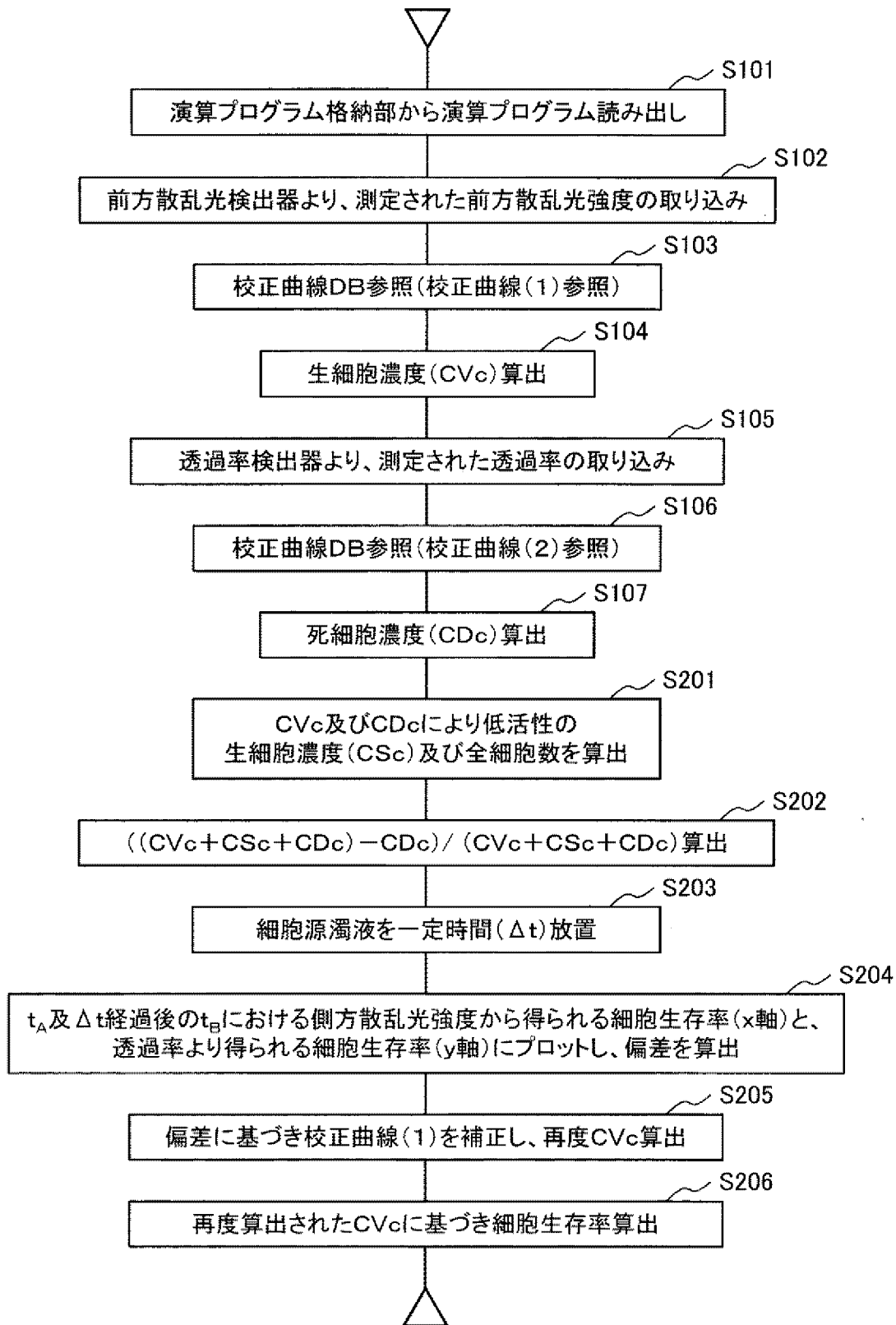
[図12]

図 12



[図13]

図 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/078033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M1/34(2006.01)i, G01N15/14(2006.01)i, G01N21/49(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/483(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) C12M1/34, G01N15/14, G01N21/49, G01N33/48, G01N33/483 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 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	JP 2012-143231 A (University of Toyama), 02 August 2012 (02.08.2012), entire text (Family: none)	1-15
Y	JP 02-500297 A (Anderson, Jeffrey E.), 01 February 1990 (01.02.1990), entire text & US 5445939 A & EP 319543 A1 & WO 1988/001385 A1	1-15
A	JP 2006-220423 A (Japan Science and Technology Agency), 24 August 2006 (24.08.2006), entire text & US 2006/0177348 A1 & EP 1688732 A2 & KR 10-2006-0090596 A	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 13 January 2015 (13.01.15)		Date of mailing of the international search report 27 January 2015 (27.01.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/078033

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 03-503808 A (Coulter Corp.), 22 August 1991 (22.08.1991), entire text & US 4981580 A & EP 423328 A1 & WO 1990/013368 A1	1-15
A	JP 2013-522644 A (Beckman Coulter, Inc.), 13 June 2013 (13.06.2013), entire text & US 2010/0075369 A1 & EP 2561350 A1 & WO 2011/119163 A1	1-15
A	JP 2012-507008 A (University of Notre Dame du Lac), 22 March 2012 (22.03.2012), entire text & US 2011/0249254 A1 & EP 2350258 A1 & WO 2010/048512 A1	1-15

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i, G01N15/14(2006.01)i, G01N21/49(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/483(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12M1/34, G01N15/14, G01N21/49, G01N33/48, G01N33/483</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2015年											
日本国実用新案登録公報	1996-2015年											
日本国登録実用新案公報	1994-2015年											
<p>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）</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2012-143231 A（国立大学法人富山大学）2012.08.02, 全文 （ファミリーなし）</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 02-500297 A（アンダーソン, ジェフリー, イー）1990.02.01, 全文 & US 5445939 A & EP 319543 A1 & WO 1988/001385 A1</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			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 2012-143231 A（国立大学法人富山大学）2012.08.02, 全文 （ファミリーなし）	1-15	Y	JP 02-500297 A（アンダーソン, ジェフリー, イー）1990.02.01, 全文 & US 5445939 A & EP 319543 A1 & WO 1988/001385 A1	1-15	
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 2012-143231 A（国立大学法人富山大学）2012.08.02, 全文 （ファミリーなし）	1-15										
Y	JP 02-500297 A（アンダーソン, ジェフリー, イー）1990.02.01, 全文 & US 5445939 A & EP 319543 A1 & WO 1988/001385 A1	1-15										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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）	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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）	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>13.01.2015</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>27.01.2015</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁（ISA/J P）</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p>野村 英雄</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>4155</td> </tr> </table>	4B	4155								
4B	4155											

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
A	JP 2006-220423 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006.08.24, 全文 & US 2006/0177348 A1 & EP 1688732 A2 & KR 10-2006-0090596 A	1-15
A	JP 03-503808 A (クールター コーポレーション) 1991.08.22, 全文 & US 4981580 A & EP 423328 A1 & WO 1990/013368 A1	1-15
A	JP 2013-522644 A (ベックマン コールター, インコーポレイテッド) 2013.06.13, 全文 & US 2010/0075369 A1 & EP 2561350 A1 & WO 2011/119163 A1	1-15
A	JP 2012-507008 A (ユニヴァーシティー オブ ノートル ダム デュ ラック) 2012.03.22, 全文 & US 2011/0249254 A1 & EP 2350258 A1 & WO 2010/048512 A1	1-15