

(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12月29日(29.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/208356 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/066510
- (22) 国際出願日: 2016年6月2日(02.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-128889 2015年6月26日(26.06.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社ニコン(NIKON CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 Tokyo (JP). 学校法人東京女子医科大学 (TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町8-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 梅▲崎▼ 理司(UMEZAKI Tadashi); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 福武 直樹(FUKU-TAKE Naoki); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 渡辺

俊二(WATANABE Shunji); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 瀧 優介(TAKI Yusuke); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 原口 裕次(HARAGUCHI Yuji); 〒1628666 東京都新宿区河田町8-1 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP). 清水 達也(SHIMIZU Tatsuya); 〒1628666 東京都新宿区河田町8-1 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP).

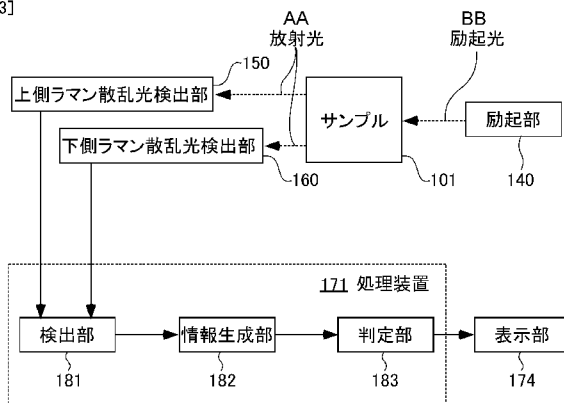
- (74) 代理人: 龍華国際特許業務法人(RYUKA IP LAW FIRM); 〒1631522 東京都新宿区西新宿1-6-1 新宿エルタワー22階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, 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,

[続葉有]

(54) Title: DETERMINATION DEVICE, DETERMINATION PROGRAM, DETERMINATION METHOD, CELL SHEET MANUFACTURING DEVICE, AND CELL SHEET MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称: 判定装置、判定プログラム、判定方法、細胞シート製造装置、および細胞シート製造方法

[図3]



- 101... SAMPLE
- 140... EXCITATION UNIT
- 150... UPPER RAMAN SCATTERING LIGHT DETECTION UNIT
- 160... LOWER RAMAN SCATTERING LIGHT DETECTION UNIT
- 171... PROCESSING DEVICE
- 174... DISPLAY UNIT
- 181... DETECTION UNIT
- 182... INFORMATION GENERATING UNIT
- 183... DETERMINATION UNIT
- AA... EMITTED LIGHT
- BB... EXCITATION LIGHT

(57) Abstract: A determination device is provided with a determination unit for determining the state of a cell using information on uniformity of a detection target generated on the basis of light intensity of light emitted from the detection target included in biological cells that have been irradiated with excitation light. In the determination device, the detection target may be a protein. In addition, the determination device may be provided with an information generating unit for generating information, wherein the information generating unit may generate information in which information corresponding to a non-resonant background signals is removed.

(57) 要約: 判定装置であって、励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された前記検出対象の一様性に関する情報を用いて、細胞の状態を判定する判定部を備える。上記判定装置において、検出対象はタンパク質であってもよい。また、上記判定装置において、情報を生成する情報生成部を備え、情報生成部は、非共鳴バックグラウンド信号に対応する情報を取り除いた情報を生成してもよい。



WO 2016/208356 A1



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), 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))

明 細 書

発明の名称：

判定装置、判定プログラム、判定方法、細胞シート製造装置、および細胞シート製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、判定装置、判定プログラム、判定方法、細胞シート製造装置、および細胞シート製造方法に関する。

背景技術

[0002] 非線形光学効果により発生するCARS光（アンチストークスラマン散乱光）等により生体標本を非侵襲で評価する方法がある（例えば、特許文献1参照）。

特許文献1 特開2005-062155号公報

発明の概要

[0003] 生体標本をユーザが観察して生死に関する状態を判定しているので、作業効率の向上が望まれている。

[0004] 本発明の第1の態様においては、励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された検出対象の一様性に関する情報を用いて、細胞の状態を判定する判定部を備える判定装置が提供される。

[0005] 本発明の第2の態様においては、励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された検出対象の一様性に関する情報を用いて、細胞の状態を判定する判定ステップをプロセッサに実行させる判定プログラムが提供される。

[0006] 本発明の第3の態様においては、励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された検出対象の一様性に関する情報を用いて、細胞の状態を判定する判定段階を備える判定方法が提供される。

[0007] 本発明の第4の態様においては、細胞を単離して細胞株を用意する用意部と、細胞株を細胞シートに培養する培養部と、上記の判定装置とを備える細胞シート製造装置が提供される。

[0008] 本発明の第5の態様においては、細胞を単離して細胞株を用意する用意段階と、細胞株を細胞シートに培養する培養段階と、上記の判定装置により細胞の状態を判定する判定段階とを備える細胞シート製造方法が提供される。

[0009] 上記した発明の概要は、本発明の特徴の全てを列挙したものではない。これらの特徴群のサブコンビネーションも発明となり得る。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]判定装置100の模式図である。

[図2]CARS過程の概念を示す模式図である。

[図3]判定装置100のブロック図である。

[図4]判定装置100における判定手順を示す流れ図である。

[図5]タンパク質から放射されたCARS光により形成された画像を示す図である。

[図6]脂質から放射されたCARS光により形成された画像を示す図である。

[図7]合成した画像を示す図である。

[図8]画像から細胞核の領域を抽出した様子を示す図である。

[図9]画像における細胞核のひとつを拡大して示す図である。

[図10]タンパク質から放射されたCARS光により形成された画像を示す図である。

[図11]脂質から放射されたCARS光により形成された画像を示す図である。

[図12]合成した画像を示す図である。

[図13]画像から細胞核の領域を抽出した様子を示す図である。

[図14]画像における細胞核のひとつを拡大して示す図である。

[図15]輝度値のコントラストの分布を示す模式図である。

[図16]輝度値のコントラストの分布を示す模式図である。

- [図17]輝度値の発現度数を示すグラフである。
- [図18]輝度値の発現度数を示すグラフである。
- [図19]平均値を原点にシフトした様子を示すグラフである。
- [図20]ガウスフィッティングに基づく一様性の概念を示すグラフである。
- [図21]ガウスフィッティングに基づく一様性の概念を示すグラフである。
- [図22]累積輝度値に基づく一様性の概念を示すグラフである。
- [図23]累積輝度値に基づく一様性の概念を示すグラフである。
- [図24]生細胞におけるタンパク質分布を例示する図である。
- [図25]一様性に関する情報の概念を説明する図である。
- [図26]死細胞におけるタンパク質分布を例示する図である。
- [図27]一様性に関する情報の概念を説明する図である。
- [図28]細胞の生死状態の判定方法を説明する図である。
- [図29]一様性に関する情報の概念を説明する図である。
- [図30]一様性に関する情報の概念を説明する図である。
- [図31]細胞シートの製造装置200のブロック図である。
- [図32]製造装置200における細胞シートの製造手順を示す流れ図である。
- [図33]サンプル101の構造を示す模式的断面図である。
- [図34]対照サンプルの光学顕微鏡写真401である。
- [図35]対照サンプルの光学顕微鏡写真402である。
- [図36]CARS過程による生細胞の観察過程を模式的に示す図である。
- [図37]CARS過程による死細胞の観察過程を模式的に示す図である。

発明を実施するための形態

- [0011] 以下、発明の実施の形態を通じて本発明を説明するが、下記の実施形態は請求の範囲に係る発明を限定するものではない。また、実施形態の中で説明されている特徴の組み合わせの全てが発明の解決手段に必須であるとは限らない。
- [0012] 図1は、判定装置100の全体的な構成を示す模式図である。判定装置100は、ステージ110、対物光学系120、レーザ装置130、励起部1

40、上側ラマン散乱光検出部150、下側ラマン散乱光検出部160、および制御部170を備える。

- [0013] ステージ110は、判定装置100の判定対象となるサンプル101を、サンプル101を収容した容器の周縁部で支持する。また、ステージ110は、サンプル101の図中下面を露出させる開口を有する。これにより、ステージ110に置かれたサンプル101に対して、図中下側からサンプル101に向かって励起光を照射できる。また、サンプル101から発生した放射光を、ステージ110の下側からも検出できる。
- [0014] ステージ110は、ステージスキャナ111に結合される。ステージスキャナ111は、図中に矢印x-y-zにより示すように、サンプル101が置かれた面と平行および垂直にステージ110を駆動する。これにより、判定装置100においては、光学系の光軸を固定したまま、サンプル101において立体的な広さを有する検出対象領域から、サンプル101が発生する放射光を検出できる。
- [0015] 対物光学系120は、ステージ110に対して互いに反対側に配された上側対物レンズ121および下側対物レンズ122を有する。図示の判定装置100においては、下側対物レンズ122が、サンプル101に対して照射された励起光を、サンプル101の内部で集光する役割も担う。
- [0016] なお、対物光学系120において、上側対物レンズ121および下側対物レンズ122は、互いに略等しい開口数を有することが好ましい。これにより、コヒーレントな励起光を照射することでサンプル101から発生するコヒーレントな放射光を検出する場合に、画像あるいはスペクトルにアーチファクトが重畳されて、検出精度が低下することを防止できる。より具体的には、上側対物レンズ121の開口数と下側対物レンズ122の開口数との比 R_{NA} は、右式 $[0.8 < R_{NA} < 1.2]$ を満たすことが好ましい。
- [0017] レーザ装置130は、複数のレーザ光源131、132と、コンバイナ133とを有する。レーザ光源131、132が発生するパルスレーザは、互いに異なる波長 λ_s 、 λ_p を有する。レーザ光源131、132としては、例

例えば、モードロックピコ秒Nd:YVO₄レーザ、モードロックピコ秒イットリビウムレーザ等を用いることができる。

[0018] なお、レーザ光源131、132の一方を、レーザ光源131、132の他方が発生したパルスレーザの波長を変換する光パラメトリック発振器に置き換えてもよい。また、判定対象となる細胞への侵襲を軽減する目的で、励起光としてのパルスレーザのパルス長は、より短くすることが好ましい。

[0019] レーザ光源131、132が発生したピコ秒パルスのうち、短い方の波長 λ_p を有するパルスレーザは、ラマン散乱光の一例として、例えばCARS光をサンプル101において発生させる場合のポンプ光として使用できる。また、レーザ光源131、132の発生するピコ秒パルスのうち、長い方の波長 λ_s を有するパルスレーザは、サンプル101を励起する励起光、例えば、CARS光を発生させる場合のストークス光として使用できる。なお、判定対象となる細胞への侵襲を軽減する目的で、励起光の波長は、より長いものを用いることが好ましい。

[0020] レーザ光源131、132から射出されたレーザ光は、コンバイナ133に入射されて単一のレーザビームになる。これにより、ポンプ光とストークス光とを併せた励起光をサンプル101の同じ位置に同時に照射して、CARS光等のラマン散乱光を発生する非線形光学効果をサンプル101において発生させることができる。

[0021] なお、レーザ装置130は、レーザ光源131、132が発生するポンプ光とストークス光とを位相同期させる目的で、いずれかのレーザ光を遅延させる遅延光路を備えてもよい。遅延光路は、互いの間隔を変更できる複数の反射鏡により形成できる。また、レーザ装置130においては、フォトニック結晶ファイバを用いてストークス光を広帯域化してもよい。

[0022] 励起部140は、ガルバノスキャナ141およびスキャンレンズ142を有する。ガルバノスキャナ141は、互いに平行ではない2つの揺動軸の周りを揺動する反射鏡を備え、入射した励起光の光路を、光軸と交差する方向に二次元的に変位させる。

- [0023] スキャンレンズ142は、ガルバノスキャナ141から射出された励起光を、予め定められた一次像面143上に合焦させる。これにより、レーザ装置130から射出された励起光でサンプル101の検出対象領域を走査させ、予め定められた広さを有する検出対象領域に励起光を照射できる。
- [0024] 上側ラマン散乱光検出部150は、反射鏡151、リレーレンズ152、153、帯域通過フィルタ154、および光電子増倍管155を有する。反射鏡151は、サンプル101において発生したラマン散乱光を反射して、リレーレンズ152、153、帯域通過フィルタ154、および光電子増倍管155に導く。なお、反射鏡151に換えて、ラマン散乱光の波長を選択的に反射するダイクロイックミラーを設けてもよい。
- [0025] 更に、帯域通過フィルタ154は、励起部140からの励起光を吸収または反射しつつ、サンプル101から発生したラマン散乱光を透過する。これにより、光電子増倍管155は、サンプル101から発生したラマン散乱光を効率よく検出できる。
- [0026] 下側ラマン散乱光検出部160は、ダイクロイックミラー161、リレーレンズ162、163、帯域通過フィルタ164、および光電子増倍管165を有する。ダイクロイックミラー161は、励起部140がサンプル101に向かって照射した励起光を高効率に透過させる。また、ダイクロイックミラー161は、サンプル101において発生したラマン散乱光を反射して、リレーレンズ162、163に導く。
- [0027] 帯域通過フィルタ164は、励起部140からの励起光を吸収または反射しつつ、サンプル101から発生したラマン散乱光を透過する。これにより、光電子増倍管165は、サンプル101から発生したラマン散乱光を効率よく検出できる。
- [0028] 制御部170は、処理装置171、マウス172、キーボード173、および表示部174を有する。マウス172およびキーボード173は、処理装置171に接続され、処理装置171にユーザの指示を入力する場合に操作される。表示部174は、マウス172およびキーボード173によるユ

ーザの操作に対してフィードバックを返すと共に、処理装置171が生成した画像または文字列をユーザに向かって表示する。更に、図示の判定装置において、表示部174には判定結果も示される。

[0029] 処理装置171は、レーザ装置130、ステージスキャナ111、およびガルバノスキャナ141の動作を制御する。また、処理装置171は、サンプル101において発生したCARS光等のラマン散乱光の光強度を検出して、サンプル101の状態、例えば、サンプル101における細胞の生死に関する状態を判定する。これにより、サンプル101の生死に関する状態の判定を自動化できる。なお、光強度は、用いる検出器の種類に応じて、輝度、照度、光度等として検出できる。

[0030] 上記のような判定装置100において、図中に点線で示すように、励起部140から射出された励起光は、反射鏡144で反射され、ダイクロイックミラー161を透過された後、ステージ110上のサンプル101に図中下方から照射される。励起光は、下側対物レンズ122によりサンプル101の内部で集光されるので、サンプル101においては、励起光が集光した位置において、サンプル101に含まれる分子の組成に応じた波長を有するラマン散乱光が高い確率で発生する。よって、上側ラマン散乱光検出部150および下側ラマン散乱光検出部160により、サンプル101において発生したラマン散乱光を検出できる。

[0031] なお、サンプル101に対して励起部140と同じ側に配置された下側ラマン散乱光検出部160により検出するラマン散乱光は、恰もサンプル101により反射された、言わば反射ラマン散乱光である。一方、サンプル101に対して励起部140と反対側に配置された上側ラマン散乱光検出部150により検出するラマン散乱光は、恰もサンプル101を透過した、言わば透過ラマン散乱光である。

[0032] 多くの場合、反射ラマン散乱光による検出の分解能は、透過ラマン散乱光による検出の分解能よりも高い。換言すれば、透過ラマン散乱光による検出は、サンプル101の大局的な状態を把握する場合に適している。よって、

目的に応じて、上側ラマン散乱光検出部150と下側ラマン散乱光検出部160とを適宜使い分けることが好ましい。

[0033] 図2は、判定装置100において、サンプル101が励起光を照射された場合に、ラマン散乱光の一例であるCARS光を発生するCARS過程を説明する模式図である。CARS過程は、互いに異なる光周波数 ω_1 、 ω_2 を有するポンプ光およびストークス光の二つのレーザ光を含む励起光をサンプル101に照射して、ポンプ光の光周波数 ω_1 とストークス光の光周波数 ω_2 との差 $[\omega_1 - \omega_2]$ が、判定対象に含まれる分子の固有振動の角振動数 ω_0 と一致した場合に発生する。

[0034] CARS過程により、判定対象に含まれる特定の分子構造の振動モードが励振されると、分子振動が光周波数 ω_3 を有する第3のレーザ光であるプローブ光と相互作用することにより、三次の非線形分極に由来するCARS光が発生する。

[0035] なお、ポンプ光はプローブ光としても利用できるもので、 $[\omega_1 = \omega_3]$ という条件の下で、CARS光が発生する。検出対象において発生するCARS光は、 $[\omega_{\text{CARS}} = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3]$ を満たす光周波数を有する。

[0036] よって、検出対象から射出されたCARS光を検出することにより、判定対象に含まれる特定の分子構造、例えば官能基の存在を非侵襲に検出できる。また、励起光を判定対象に照射する位置を変えながら繰り返しCARS光を検出することにより、判定対象における特定の分子構造の分布を画像化することもできる。

[0037] CARS光は自発ラマン散乱光等に比べると光強度が高いため、光電気変換素子を用いた場合に短時間で検出できる。よって、検出に要する時間が単に短くなるばかりではなく、ビデオレートでの観察もできる。これにより、特定分子構造の分布だけでなく、分布の変化も検出できる。また、判定対象に照射する励起光の帯域を、細胞に与えるダメージが少ない赤外帯域とすることにより、判定対象の細胞を生かしたまま観察できる。

[0038] 更に、非線形光学効果により生じるCARS光は、下側対物レンズ122

により励起光が絞り込まれた極めて狭い領域において発生する。このため、CARS光検出の対象となる領域は、励起光の光軸に交差する方向と、光軸と平行な方向の両方に関して狭い領域となる。よって、CARS光による判定対象の観察は、立体的に高い解像度を有する。

[0039] よって、赤外帯域または近赤外帯域の励起光を用いて、観察平面を判定対象の内部に形成してもよい。また、観察平面を、判定対象の深さ方向に順次移動させることにより、特定の分子構造の三次元的な分布を反映した画像を生成できる。

[0040] なお、上記のように、コヒーレントな励起光をサンプル101に照射した場合に非線形光学効果を生じる現象は、CARS光の他に誘導ラマン散乱等のラマン散乱光を生じる現象や、多光子励起による蛍光を生じる現象や、第二高調波、第三高調波などの高調波を生じる現象などが知られている。これらの非線形現象により生じた光のうち、ラマン散乱光を検出することにより、サンプル101における特定の分子構造の三次元的な分布を反映した画像を生成できる。

[0041] なお、ラマン散乱光ではなくても、サンプル101の三次元的な構造を反映した画像を生成することはできる。よって、判定装置100は、レーザ装置130が射出するレーザ光の波長や各種フィルタの波長特性等を適切に調整することにより、多光子励起蛍光、第二高調波、第三高調波、誘導ラマン散乱等によりサンプル101から発生した放射光を検出する場合に使用することもできる。

[0042] 図3は、判定装置100のブロック図である。図1を参照して説明した通り、サンプル101に対して励起部140から励起光が照射されると、サンプル101においてCARS光等のラマン散乱光が発生する。サンプル101において発生したラマン散乱光は、上側ラマン散乱光検出部150および下側ラマン散乱光検出部160により検出される。

[0043] 判定装置100において上側ラマン散乱光検出部150および下側ラマン散乱光検出部160に接続された処理装置171には、検出部181、情報

生成部 182、および判定部 183 が実装されている。検出部 181、情報生成部 182、および判定部 183 の動作は、処理装置 171 に予め格納されたプログラム、あるいは、媒体または通信回線を通じて処理装置 171 にロードされたプログラムにより実行されてもよい。

[0044] 検出部 181 は、上側ラマン散乱光検出部 150 および下側ラマン散乱光検出部 160 の少なくとも一方から、検出した CARS 光等のラマン散乱光の情報として、例えば輝度値等の光強度を反映した情報を取得する。また、検出部 181 は、取得した光強度を、サンプル 101 における空間的な位置と関連付けて格納する。なお、検出部 181 は、取得した光強度をまず離散化して、デジタル化された光強度の値と位置とを関連付けて格納してもよい。

[0045] 情報生成部 182 は、空間的な位置に関連付けて格納された光強度値に基づいて、サンプル 101 の複数の位置において検出され取得された光強度値の一様性を、例えば数値化した情報を生成する。本実施例では、一様性とは、ある時点におけるサンプル 101 内の二次元空間内または三次元空間内での検出対象の密度の様子である。空間内に検出対象が分散して検出対象の密度が均一になればなるほど一様性が高くなり、空間内で検出対象が凝集して検出対象の密度のばらつきが大きくなればなるほど一様性が低くなる。判定部 183 は、数値化された一様性を予め定めた閾値と比較する簡易な処理により、判定対象であるサンプル 101 に含まれる細胞の生死に関する状態を迅速に判定できる。

[0046] なお、処理装置 171 は、判定結果を、例えば表示部 174 に出力してユーザに示す。あるいは、検出対象となったサンプル 101 の個体を識別する情報と判定結果とを関連付けて、処理装置 171 に判定結果を蓄積してもよい。

[0047] 判定装置 100 で観察された細胞の状態と細胞の既知の状態とを対照させることにより判定装置 100 による判定基準を決めるために、図 33 に示すサンプル 101 を作成した。図 33 は、サンプル 101 の構造を示す模式的

断面図である。サンプル101は、判定対象となる単層の細胞シート109と、当該細胞シート109を封止するスライドガラス102、スペーサ103、およびカバーガラス104とを含む。

[0048] サンプル101においては、スライドガラス102とカバーガラス104との間に、封入液106に浸漬された状態で、細胞シート109を封入した。また、スライドガラス102およびカバーガラス104の間には、細胞シート109を包囲する環状のスペーサ103を挟み、細胞シート109を封入した。スペーサ103としては、シリコンゴムのリングを用いた。

[0049] 更に、サンプル101においては、スライドガラス102、スペーサ103、およびカバーガラス104の、それぞれの間隙を、封止材105により気密に封止した。封止材105としては、市販のネイルエナメルを用いた。

[0050] 一般的に、細胞が死亡した状態では細胞膜が破壊されている。サンプル101に封入した細胞シート109は、生きている筋芽細胞すなわち細胞膜が破壊せず維持されている筋芽細胞であり、蛍光染色し易い単層の細胞シートにして封入する。封入液106は、細胞膜の破壊を検出する染色試薬を含むゲル状の封入液を用いた。これにより、サンプル101に、細胞シート109の細胞が死ぬことによって浮遊細胞となることによる観察環境の悪化を抑制できる。また、封入液106に混入した染色試薬により、蛍光を検出する場合や、色素で検出する場合がある。染色試薬は、細胞が死ぬことにより細胞膜が破壊された細胞核内に浸入し、細胞核内に豊富に存在するタンパク質を染色する。よって、サンプル101においては、細胞核内が染色試薬で染色されたことを光学顕微鏡で外部から検出することにより、封入された細胞シート109が死んだ状態であることを判定することができる。

[0051] 図34は、上記のように作製したサンプル101を、封止材105により封止して20時間から48時間の間の時間が経過した後に観察して撮影した光学顕微鏡写真401である。なお、サンプル101は、常に37℃に保温され、顕微鏡で観察する間も、ステージ上に設けた加温機器により37℃を維持された。光学顕微鏡写真401によると、観察領域に存在する染色され

た細胞は僅かであり、細胞シート109に含まれる細胞の殆どが生きている状態であることが判る。

[0052] 図35は、上記のサンプル101を、封止材105により封止した時刻から起算して8時間後、即ち、図34に示した状態から7時間が経過した後に観察して撮影した光学顕微鏡写真402である。なお、サンプル101は、前の観察から後も常に37℃に保温し、顕微鏡で観察する間も、ステージ上に設けた加温機器により37℃を維持した。

[0053] 光学顕微鏡写真402によると、染色された細胞が増加して、観察領域全体に広く分布していることが判る。これは、サンプル101に封入された細胞シート109に含まれる多くの細胞が、前の観察よりも後に、生きている細胞（「生細胞」と記載する場合がある）から死んでいる細胞（「死細胞」と記載する場合がある）に状態が変化したことを示す。細胞シート109の細胞の死因は、封入液106中の酸素の不足、封止材105に含まれる有機溶剤によるものであると推測される。

[0054] 本実施の形態では、細胞膜が破壊して細胞核内のタンパク質が上記のように染色試薬により染色される状態にある細胞を死細胞とし、その状態において同じサンプル101をCARS過程により生じたラマン散乱光により検出した状態を、細胞が死んでいると判定装置100で判断するときの基準とする。一方、細胞膜が破壊せずに維持されており、細胞核内のタンパク質が染色試薬により染色されない状態にある細胞を生細胞とし、その状態において同じサンプル101をCARS過程により生じたラマン散乱光により検出した状態を、細胞が生きていると判定装置100で判断するときの基準とする。

[0055] 図4は、判定装置100における判定手順の一例を示す流れ図である。判定装置100においては、まず、例えばユーザがサンプル101をステージ110にセットする（ステップS101）。大量のサンプル101を判定する場合は、ステージ110へのサンプル101のセットおよび判定後のサンプル101の搬出をオートメーション化してもよい。

- [0056] 次に、判定装置100の制御部170は、ステージ110にセットされたサンプル101に対して、励起部140から励起光を照射する。これにより、下側対物レンズ122の焦点に集光された励起光により、サンプル101からラマン散乱光が発生する（ステップS102）。
- [0057] 次に、制御部170は、励起光を照射されたサンプル101において発生したCARS光等のラマン散乱光を、上側ラマン散乱光検出部150および下側ラマン散乱光検出部160の少なくとも一方により検出する（ステップS103）。更に、制御部170は、励起光が照射された位置において発生したラマン散乱光を、検出部181により光強度値として取得する（ステップS104）。
- [0058] 次に、制御部170は、判定対象における検出対象領域において、未検出の位置がないかどうかを調べる（ステップS105）。ステップS105において未検出の位置が残っていた場合（ステップS105:NO）、制御部170は、ステージスキャナ111およびガルバノスキャナ141のいずれかを動作させて、検出対象領域における未検出の位置に励起光が集光されるように、サンプル101または励起光の光路を移動させた後、制御をステップS102に戻す。
- [0059] これにより、判定装置100は、サンプル101における未検出の位置に励起光を照射して（ステップS102）、他の光強度値を検出部181に取得させる（ステップS104）手順を繰り返す。制御部170は、予め定めた検出対象領域において未検出の位置がなくなるまで上記ステップS102からステップS105までの手順を繰り返し、検出された複数の光強度値を、それぞれの光強度値が検出されたサンプル101における位置に対応付けて蓄積する。
- [0060] サンプル101の検出対象領域において未検出の位置がなくなった場合（ステップS105:YES）、制御部170は、サンプル101において、未検出の検出対象が存在していないかどうかを調べる（ステップS106）。ここで、未検出の検出対象とは、例えば、サンプル101としての細胞に

おけるタンパク質を当初の検出対象とした場合に、当該細胞における脂質である。

[0061] なお、サンプル101が大きい場合には、更に、ひとつのサンプル101内に、他の未検出の検出領域が残っていないかどうかを調べ、残っている場合には、未検出の検出領域が無くなるまで検出を繰り返してもよい。これにより、サンプル101において劣化しやすいことが判っている部位、例えば、サンプル101の周縁、表面等の一部を選んで検出対象領域とすることにより、判定の精度とスループットとを両立できる。

[0062] ステップS106において、未検出の検出対象領域が残っていることが判った場合（ステップS106：NO）、制御部170は、ステージスキャナ111およびガルバノスキャナ141のいずれかを動作させて、未検出の検出対象領域に励起光を照射できるように、サンプル101または励起光の光路を移動させた後、制御をステップS102に戻す。よって、制御部170には、次の検出対象領域について、検出された複数の光強度値を、それぞれの光強度値が検出されたサンプル101における位置に対応付けて蓄積する。

[0063] ステップS106において、未検出の検出対象領域が残っていないことが判った場合（ステップS106：YES）、制御部170は、光強度値を取得した検出対象領域の各々について、取得した光強度値を画像化する（ステップS107）。ここで、判定装置100における「画像化」とは、ひとつの検出対象領域に対して、複数の光強度値と、当該複数の光強度値の各々を検出した検出位置とを関連付けて蓄積した情報群を意味し、必ずしもユーザが視認できる画像を意味するものではない。また、当該情報群に含まれる検出位置は、三次元的なものである場合も含む。

[0064] 画像化された光強度値の例として、二次元的に視覚可能な画像に変換した輝度値を図5に例示する。判定対象として、哺乳類の細胞を培養して作製し、生細胞すなわち染色試薬により細胞核が染色されない細胞により形成された細胞シートを用いた。また、判定装置100における励起部140が発生

する励起光の波長と、上側ラマン散乱光検出部 150 および下側ラマン散乱光検出部 160 における帯域通過フィルタ 154、164 の帯域特性、およびダイクロイックミラー 161 の帯域特性は、下記の表 1 に示す通りとして、サンプル 101 において CARS 光を発生させた。

[0065] [表1]

レーザ光源 131	発光波長 [nm] : 1120~1600
レーザ光源 132	発光波長 [nm] : 1064
帯域通過フィルタ 154	透過帯域 [nm] : 800~1010
帯域通過フィルタ 164	遮断帯域 [nm] : 350~770 1030~1650
ダイクロイックミラー 161	透過帯域 [nm] : 380~750 1064~1600 反射帯域 [nm] : 800~1010

[0066] 図 5 に示す画像は、上記細胞シートにおけるタンパク質の存在に対応する CARS 光の輝度値を画像化している。ただし、表示方法として、濃色の部分が輝度の高い領域、即ち、タンパク質がより多く存在する位置を示す。

[0067] 図 6 は、同じ細胞シートについて、脂質の存在に対応する CARS 光の輝度値を画像化した画像を示す。当該画像も、濃色の部分が輝度の高い領域、即ち、脂質がより多く存在する位置を示す。図示のように、サンプル 101 としての細胞シートにおいては、タンパク質と脂質とが略排他的に存在していることが判る。

[0068] 図 7 は、図 5 に示した画像と、図 6 に示した画像とを合成して、タンパク質から発生した放射光の輝度値と、脂質から発生した放射光の輝度値との差に基づいて生成した細胞シートの画像である。これにより、サンプル 101 としての細胞シートにおいて、細胞核が占める領域が明瞭に判り、単なる空乏等と容易に区別できる。

[0069] なお、本実の形態では、検出対象としてタンパク質および脂質を用いているが、これに代えて、タンパク質および脂質のように、細胞に含まれており且つ特定の波長で信号強度にピークをもつ成分であれば、そのピーク位置および強度等から成分を識別することができるので、このような条件を満たす成分であれば、タンパク質および脂質以外の成分を検出対象とし、その分布

に基づいて細胞の状態を判定してもよい。検出対象としては、細胞核内に局在している成分であることがより好ましい。

[0070] また、CARS光を検出する場合には、CARS光自体と共に、屈折率情報を含む非共鳴バックグラウンド信号が不可避に検出される。光共鳴バックグラウンド信号は、CARS光の検出においてはノイズとなり、生成される観察画像のコントラスト、分解能を低下させる。よって、検出対象から発生したCARS光により検出対象の状態を判定する場合は、非共鳴バックグラウンド信号の影響を排除することが好ましい。

[0071] 細胞において発生するCARS光を検出する場合、脂質の存在を示すC-H振動は、非共鳴バックグラウンドと容易に区別できる高い輝度でラマン散乱光を発生する。よって、脂質により生じた例えばCARS光を検出して生成した情報画像は、非共鳴バックグラウンド信号の存在にもかかわらず、脂質の存在範囲を検出できる。

[0072] 更に、細胞において、タンパク質は脂質と排他的に存在するので、タンパク質の存在により生じたCARS光で生成した画像と、脂質で発生したCARS光の画像との差分をとることにより、非共鳴バックグラウンドの影響を抑制して、タンパク質の存在を情報画像にできる。これにより、脂質が存在しないまたは脂質がタンパク質に比べて極めて少ない細胞核内においては、タンパク質の情報と脂質の情報との差分をとることにより、細胞核内において被共鳴バックグラウンドが除去されたタンパク質の情報を取り出すことができる。

[0073] このように、目的とする検出対象がタンパク質である場合に、敢えて脂質も検出対象とすることにより、タンパク質の検出精度を向上させることができる。ただし、目的とする検出対象を脂質とする場合は、脂質を直接に検出対象とすれば足りる。また、敢えて他の成分も検出対象とすることにより、脂質の検出精度をさらに向上することもできる。

[0074] なお、これら画像を合成する場合には、タンパク質と脂質とに、互いに異なる色をつけ合成してもよい。この着色は、細胞シート自体を染色するわけ

ではないので、生きている細胞シートを侵襲することなく、染色による識別の容易性が得られる。再び図4を参照すると、上記のような画像処理により、サンプル101において判定の真の対象となる細胞核が画像において占める領域を検出できる（ステップS108）。

[0075] 図8は、上記のようにして、画像化された細胞シートから抽出した細胞核が占める領域を示す画像である。図示のように、細胞核の位置と広さが判ると、制御部170は、いずれかの細胞核を含む領域について、ステップS107で得られた画像における輝度値の一様性を数値化する（ステップS109）。

[0076] 図9は、図7に点線Aで示したひとつの細胞核を含む領域を拡大して示す図である。図示のように、生きている細胞の細胞核においては、タンパク質の存在を示す輝度値が均一で、光強度値の一様性が高いことが判る。

[0077] 図9に示す画像は、細胞核が画像の広い部分を占めている。よって、図9に示した領域を数値処理することにより、当該画像の領域における細胞核における検出対象の一様性を数値化できる（ステップS109）。本実施形態では、細胞核におけるタンパク質の存在の一様性を数値化する。

[0078] 図10は、死細胞から形成される細胞シートについて、タンパク質の存在に対応するCARS光の光強度値の一例としての輝度値を取得して生成した画像を示す。濃色の部分が輝度の高い領域、即ち、タンパク質がより多く存在する位置を示すことは、図5以降の他の図と同じである。図11は、同じ細胞シートについて、脂質の存在に対応するCARS光の輝度値に基づく画像を示す。当該画像も、濃色の部分が輝度の高い領域、即ち、脂質がより多く存在する位置を示す。

[0079] 図12は、図10に示した画像と、図11に示した画像とを合成して生成した細胞シートの画像である。なお、これら画像を合成する場合も、タンパク質と脂質とに、互いに異なる色をつけてもよい。これにより、サンプル101としての細胞シートにおいて、細胞核が占める領域が明瞭に判り、単なる空乏等と容易に区別できる。これにより、サンプル101において判定の

対象となる細胞核が画像において占める領域が検出される（ステップS108）。

[0080] 図13は、上記のようにして、画像化された細胞シートから抽出した細胞核が占める領域を示す画像である。図示のように、細胞核の位置と広さが判ると、制御部170は、いずれかの細胞核を含む領域から検出した輝度値に基づいて、当該細胞核を含む細胞の生死に関する状態を判定する。

[0081] 図14は、図12に点線Bで示したひとつの細胞核を含む領域を拡大して示す図である。図示のように、死細胞の細胞核においては、タンパク質の存在を示す輝度値にムラがあり、局部的にタンパク質が少ないまたは多い領域が存在して、輝度値の一様性が低いことが判る。

[0082] すなわち、生細胞の細胞核においては、細胞核内でタンパク質が分散してタンパク質の密度がほぼ均一であるため、複数の位置間での輝度値の差が小さく、タンパク質の一様性が高い。一方、死細胞の細胞核においては、細胞核内でタンパク質が凝集してタンパク質の密度にばらつきが生じているため、複数の位置間での輝度値の差が大きく、タンパク質の一様性が低い。

[0083] 図14に示す画像は、細胞核が画像の広い部分を占めている。よって、図14に示した領域を数値により画像処理することにより、当該画像における検出対象の一様性を数値化できる（ステップS109）。本実施形態では、細胞核におけるタンパク質の存在の一様性を数値化する。

[0084] 図15は、図4に示した手順のステップS109において、判定対象におけるタンパク質の存在の一様性を数値化するひとつの方法を説明する図である。図15は、図9に示した細胞核を有する、生細胞について取得した輝度値を立体画像化した図である。

[0085] 図中に矢印X-Yで示す面が、図9の面に相当する。また、図中に矢印Zで示す方向は、X-Y平面における各位置の輝度値を示す。ただし、図5等について説明した通り、ステップS107で画像化された輝度値は、輝度値が高い方の値がマイナスになる。よって、図15のZ軸については、図中（-Z）側が、タンパク質の存在に対応する輝度値の高さを表す。

- [0086] 情報生成部182は、画像化された輝度値において、輝度値の最大のピーク値と、輝度値の平均値との比を算出することにより、タンパク質の存在の一樣性を数値化する。例えば、生細胞においては、タンパク質の存在について一樣性が高い。このため、輝度値のピーク値と平均値との比について、例えば5倍を閾値と定め、未知の判定対象について同様の比を算出した場合に、当該比が5未満の場合に、判定部183は、当該判定対象が生きていると判定できる（ステップS110）。
- [0087] 図16は、図14に示した細胞核を有する死細胞について取得した輝度値を立体画像化した図である。図中に示すX-Y-Zは、図15と同じ意味を有する。
- [0088] 情報生成部182は、画像化された輝度値において、図中に矢印Cで指し示す最大のピーク値と、輝度値の平均値との比として一樣性を数値化し、当該比を予め定めた閾値と比較する（ステップS110）。死細胞においては、タンパク質の存在について一樣性が低いので、図示の画像には大きなピークが現れ、輝度値のピーク値は、例えば、閾値の一例である5倍以上になる。よって、判定部183は、当該判定対象が死んでいると判定できる。
- [0089] また、情報生成部182は、判定対象の生物細胞のひとつの領域における最大ピーク値および最小のピーク値の比と、当該領域の周辺の領域における最大ピーク値および最小のピーク値の比との平均値を算出して、当該平均値を画像におけるコントラストを評価するコントラスト評価値としてもよい（ステップS109）。こうして生成したコントラスト評価値を、予め定めたコントラスト評価値の閾値と比較することにより（ステップS110）、未知の判定対象を、ノイズの影響を排除して容易且つ確実に判定できる。
- [0090] また、ステップS110で得られた判定結果は、例えば、ユーザに向かって出力される（ステップS111）。判定結果の出力は、例えば、表示部174に表示してユーザに知らせてもよいし、判定対象に何らかのマーキングをしてもよい。また、判定装置100に対する判定対象の搬入または搬出を自動化している場合は、判定結果に応じて異なる搬出先に判定対象を移動し

てもよい。これにより、判定対象が大量にある場合であっても、生死に関する状態を確実に判定して、例えば細胞シートを安全に利用できる。

[0091] なお、上記のように、ピーク値と平均値との比により一様性を数値化する場合、情報生成部182は、輝度値のノイズを低減する処理を実行してもよい。ノイズの低減は、例えば、図15および図16に示した空間における各々の位置に対応付けられた輝度値のそれぞれを、当該位置を含む予め定められた領域内に在る輝度値との加重平均に置き換えることにより実行できる。これにより、輝度値における突発的な値を均して、判定部183における判定精度を向上させることができる。

[0092] 図17は、図9に示した細胞核を含む、生細胞について取得した輝度値とその発現頻度のヒストグラムを示すグラフであり、一様性の数値化するステップS109の他の例を示す。なお、図5等について説明した通り、ステップS107で画像化された輝度値は、輝度値が高い方の値がマイナスになる。よって、図17の横軸においては、原点に対して図中左側が、タンパク質の存在に対応する輝度値の高さを負数で表す。

[0093] 既に説明した通り、図5から図9に示した、生細胞においては、細胞核におけるタンパク質の存在について一様性が高い。このため、図示のヒストグラムにおいて、輝度の絶対値が最大となる横軸の最大値と、輝度値の平均値との比が、相対的に小さくなる。

[0094] 図示の例では、最大の輝度に対応する値（-243.3）と、平均値（-51.1）との比（4.7）として、タンパク質の存在の一様性を数値化する（ステップS109）。よって、判定部183は、例えば、予め5と定められた閾値と、数値化された一様性とを比較することにより、未知の判定対象を容易に判定できる（ステップS110）。

[0095] なお、図8に示した、生細胞の複数の細胞核1~6（細胞核3は、図中に現れていない）について、それぞれ上記の方法で輝度の一様性を数値化した。こうして数値化した細胞核の各々におけるタンパク質の存在の一様性を下記の表2に示す。下記の通り、どの細胞核についても、輝度値の最大値と平

均値との比は、閾値の一例である5よりも低い。

[0096] [表2]

[表2 (図8の細胞核)]

細胞核1 : 4.7

細胞核2 : 3.7

細胞核3 : 4.1

細胞核4 : 3.9

細胞核5 : 3.5

細胞核6 : 2.8

[0097] 図18は、図13に示した細胞核を有する死細胞について取得した輝度値とその発現頻度のヒストグラムを示すグラフである。なお、図18においても、ステップS107で画像化された輝度値は、輝度値が高い方の値がマイナスになる。よって、図18の横軸においては、原点に対して図中左側がタンパク質の存在に対応する輝度値の高さを負数で表す。

[0098] 既に説明した通り、図10から図14に示した死んだ細胞においては、タンパク質の存在について一様性が低い。このため、図示のヒストグラムにおいて、輝度の絶対値が最大となる横軸の最大値と、輝度値の平均値との比が、相対的に大きくなる。

[0099] 図示の例では、最大の輝度に対応する値(-1113.3)と、平均値(-198.4)との比(5.6)が、前述した閾値の一例である5以上になる。よって、判定部183は、数値化された一様性と比較することにより(ステップS110)、未知の判定対象を、死んだ状態の細胞と判定できる。

[0100] なお、図13に示した死んだ細胞の複数の細胞核について、それぞれ上記の方法で輝度値の一様性を数値化した値を下記の表3に示す。下記の通り、どの細胞核についても、輝度値の最大値と平均値との比は、上記の閾値よりも高い。

[0101]

[表3]

[表3 (図13の細胞核)]

細胞核1	: 17.5
細胞核2	: 6.1
細胞核3	: 5.6
細胞核4	: 7.8
細胞核5	: 6.5
細胞核6	: 6.8

- [0102] 図19は、図18に示したグラフにおいて、輝度値の平均値を横軸の原点の位置にシフトして示したグラフであり、一様性の数値化するステップS109の他の例を示す。輝度値のヒストグラムをこのようにシフトすることは、輝度値の最大値から平均値を引いた第1の値と、輝度値の最小値から平均値を引いた第2の値とをそれぞれ算出することに他ならない。よって、図19に示したグラフの最大値と最小値との比により、サンプル101におけるタンパク質の存在の一様性を数値化できる。
- [0103] 図示の例では、マイナス側の輝度値の最大値に対するプラス側の最大値の比2.5を簡単な処理で算出して、死細胞におけるタンパク質の存在の一様性を数値化できる。同様の処理を、図17に示した、生細胞から取得した輝度値について実行すると、情報生成部182は、マイナス側の輝度値の最大値に対するプラス側の最大値の比0.8を算出して、生細胞におけるタンパク質の存在の一様性を数値化できる。よって、判定部183は、予め定めた閾値と当該比とを比較することにより、未知のサンプル101の生死に関する状態を判定する(ステップS110)。
- [0104] 図20は、ステップS109において、判定対象におけるタンパク質の存在の一様性を数値化する他の方法を説明するグラフである。なお、図5等について説明した通り、ステップS107で画像化された輝度値は、輝度値が高い方の値がマイナスになる。よって、図20の横軸においては、原点に対して図中左側が、タンパク質の存在に対応する輝度値の高さを表す。
- [0105] 図示のグラフにおける複雑に屈曲した細い曲線は、図9に示した細胞核を

有する、生細胞について取得した輝度値のヒストグラムを示す。また、図20において、上記ヒストグラムに重ねて記載された太く滑らかな曲線は、上記輝度値のヒストグラムにガウスフィッティングをかけた結果同定されたガウス関数を示す。このように、検出部181により取得された輝度値（ステップS104）に対してガウスフィッティングをかけることにより、情報生成部182は、サンプル101におけるタンパク質の存在の一様性を数値化できる（ステップS109）。

[0106] 更に、情報生成部182は、数値処理された輝度値を、例えば、ガウス関数の予め定められた傾きとなる輝度値までの度数の積算値として数値化できる。既に説明した通り、生きている細胞においては、タンパク質の存在について一様性が高い。このため、数値処理として得られたガウス関数のピークは、分布範囲の略中央に位置して正規分布に近い曲線を描く。よって、図示の例では、上記した予め定められた傾き、例えば、「 $dy/dx < 0.1$ 」となる輝度値までの度数の積算値が小さい。

[0107] よって、未知の判定対象について同様の処理をした場合、例えば、閾値として10を予め定めて比較し、得られた度数の積算値が10未満の場合に、判定部183は、当該判定対象が生きていると判定できる（ステップS110）。このように、励起光を照射された場合に、生物細胞に含まれる検出対象が発生するラマン散乱光の光強度を検出して、検出結果に基づいて検出対象の空間的一様性を反映した情報を生成して、生成した情報に基づいて細胞の状態を判定することができる。

[0108] 図21は、図14に示した細胞核を有する死細胞について取得した輝度値について取得した輝度値のヒストグラムを示す。図21においても、上記ヒストグラムに重ねて記載された太く滑らかな曲線は、上記ヒストグラムにガウスフィッティングをかけた結果同定されたガウス関数を示す。

[0109] 既に説明した通り、死細胞においては、細胞核におけるタンパク質の存在について一様性が低い。このため、数値処理として得られたガウス関数のピークが分布範囲の中央から離れた曲線を描く。よって、図示の例では、上記

した予め定められた傾きとなる輝度値までの度数の積算値が10以上となる。よって、未知の判定対象について同様の処理をした場合、得られた度数の積算値が上記閾値である10以上の場合に、判定部183は、当該判定対象が死んでいると判定できる。

[0110] なお、取得した輝度値のヒストグラムにガウスフィッティングをかけて得られたガウス関数の数値化方法は、上記のような度数の積算値に限られない。例えば、情報生成部182は、ガウス関数のピークが形成される輝度値と、輝度値の平均値との比として数値化してもよい。

[0111] 生細胞においては、細胞核におけるタンパク質の存在について一様性が高いので、数値化して得られた上記の比が小さくなり、例えば5未満となる。これに対して、死細胞から検出して取得した輝度値においては、上記の比が5以上になる。よって、タンパク質の存在の一様性を、ガウス関数がピークを形成する輝度値と平均値との比として数値化することにより、判定部183は、閾値との比較により判定対象の生死に関する状態を判定できる。

[0112] 図22は、図9に示した、生細胞を含む細胞シートについて、細胞核のひとつを含む領域の輝度を積算する数値処理して得られたローレンツ曲線を示すグラフであり、一様性の数値化するステップS109の他の例を示す。同グラフの横軸は、取得した輝度値が等しい画素の出現個数を示す。また、同グラフの縦軸は取得した輝度値の累積値を示す。

[0113] なお、図示のグラフにおいて、縦軸は、最大が1となるように正規化されている。また、図中に点線で示す直線は、累積輝度値により算出されたローレンツ曲線の対照指標となる、傾きが45度の均等配分線である。図示のグラフにおいて、ローレンツ曲線の均等配分線からの乖離は、図中に斜線で示す領域の面積により数値化できる（ステップS109）。よって、当該面積の値を、予め定めた閾値と比較することにより、サンプル101における細胞が生きている状態か否かを判定できる（ステップS110）。

[0114] 図23は、図14に示した、死細胞を含む細胞シートについて、ステップS109において、細胞核のひとつを含む領域の輝度値の分布を数値化して

得られたローレンツ曲線を示すグラフである。図示のように、図中に斜線で示すローレンツ曲線の均等配分線からの乖離を、斜線により示す領域の面積により数値化できる（ステップS109）。また、図23に示した斜線領域の面積は、図22に示したグラフに対して明らかに広く、予め定めた閾値と当該領域の面積とを比較することにより、サンプル101に含まれる細胞の生死に関する情報を判定できる（ステップS110）。

[0115] このように、未知の判定対象について、ステップS101からステップS109までのステップを実行して、当該判定対象におけるタンパク質の存在の一様性を数値化した後、当該数値を予め決定した閾値と比較する（ステップS110）ことにより、判定対象の細胞が活着しているか、死んでいるか、あるいは、まだ死んでいないが死につつつあるかを迅速且つ確実に判定できる。

[0116] なお、上記のステップS110において用いられる閾値は、生死に関する状態が予め判っているサンプル101について、上記ステップS101からステップS109までを実行することにより決定できる。例えば、活着していることが予め判っている細胞シートについて、ステップS101からステップS109までを実行することにより、生細胞の細胞核におけるタンパク質の存在の一様性を数値化した場合の数値範囲を知ることができる。よって、当該数値範囲を規定する数値を閾値と定めることにより、細胞が活着していることを判定する閾値を決定できる。

[0117] 同様に、細胞が死んでいることが予め判っている細胞シートについて、ステップS102からステップS109まで実行することにより、細胞が死んでいることを判定する場合の閾値を得てもよい。細胞の生死に関する状態の判定結果は、必ずしも生または死のいずれか一方であるとは限らない。生物の細胞が活着している状態から死んだ状態に遷移するまでには時間がかかり、言わば、細胞が死に始めてから死に切るまでの中間的な状態もあり得る。よって、細胞が活着していることを判定する閾値とは別に、細胞が死んでいることを判定する閾値を設け、更に、それらの閾値の中間の状態も生死に関する

状態として併せて判定してもよい。

[0118] 上記した判定方法に代えて、細胞の生死に関する状態を他の方法で判定してもよい。例えば、上記したヒストグラムの平坦部分の長さが所定値よりも大きい場合には、細胞が死んだ状態であると判定し、平坦部分の長さが所定値よりも小さい場合には、細胞が生きている状態であると判定することができる。細胞の生死を判断する平坦部分の長さの閾値は、予め生死が判っている試料を観察することにより決定してもよい。また、細胞の使用目的等に合わせて、閾値を調整してもよい。

[0119] また、細胞の生死に関する状態を判定する他の方法として、上記したヒストグラムのピーク値を含む山の半値幅と、当該ヒストグラムの平坦部分の長さを比較してもよい。この場合、平坦部分の長さが大きい場合は細胞が死んだ状態であると判定し、平坦部分の長さが小さい場合には細胞が生きた状態であると判定できる。

[0120] また、上記したヒストグラムの頻度がピークとなる輝度値の位置が、全測定範囲の中心を含む予め定めた範囲の外にある場合には、細胞が死んだ状態であると判定し、ピークとなる輝度値の位置が当該範囲の内側にある場合は、細胞が生きた状態であると判定することができる。

[0121] 更に、ヒストグラムのピークの位置が全測定範囲の中心を含む、予め定めた第1の範囲の内側にある場合は、判定対象の細胞が生きた状態であると判定し、当該ピークの位置が上記第1の範囲とは異なる領域に定められた第2の範囲の内側にある場合には、当該細胞が死んだ状態であると判定できる。更に、当該ピークの位置が、上記第1の範囲および上記の第2の範囲のいずれの範囲でもない範囲にある場合には、判定対象の細胞が、死につつある生と死との中間的な状態であると判定できる。

[0122] また更に、細胞が生きている状態、死んでいる状態、および生と死との中間的な状態とのそれぞれについて、予め状態が判っている細胞を観察して検出したヒストグラムの形状を記憶しておき、判定対象の細胞から検出したヒストグラムの形状と、記憶しているヒストグラムの形状とを比較して、形状

の一致率から細胞の生死に関する状態を判定できる。

[0123] 図24から図28は、また他の判定方法を説明する図である。図24は、判定装置100において、生きていることが予め判っている細胞を観察して得られた観察画像を示す。図示の観察画像においては、判定対象となる細胞における核内のタンパク質分布が、CARS過程を利用して可視化されている。図示のように、生きた細胞の観察画像における細胞核に対応する領域においてはタンパク質が一様に分布している。

[0124] 図25は、図24に示した観察画像を二次元フーリエ変換した結果を示す画像である。なお、観察画像を二次元フーリエ変換する場合は、原色分解またはグレースケール変換により観察画像を単色化した上で二次元フーリエ変換している。このようにして二次元フーリエ変換して得た画像を、以下、変換画像と記載する。図示のように、タンパク質が一様に分布する観察画像から得られた変換画像においては、輝度が高い領域が中央付近に集中して形成される。なお、変換画像において輝度が高い領域を、以下、フーリエ領域と記載する。

[0125] 図26は、判定装置100において、死んでいることが予め判っている細胞を観察して得られた観察画像を示す。図示の観察画像においては、判定対象となる細胞の核内に、著しく輝度が高い領域が点在することが可視化されている。図示のように、死細胞の観察画像における細胞核に対応する領域においては、局部的にタンパク質が分布する領域が観察画像に現れる。

[0126] 図27は、図26に示した観察画像を二次元フーリエ変換して得た変換画像を示す。図示の変換画像も、変換処理に先立って、原色分解またはグレースケール変換により観察画像を単色化した上で二次元フーリエ変換処理を実行している。図示のように、タンパク質が局部的に分布する観察画像から得られた変換画像においては、図25に示した画像と比較すると、輝度が高い領域が広がっている。

[0127] 図28は、上記のようにして得られた変換画像に基づいて、観察対象の細胞の生死に関する状態を判定する場合の閾値を示す図である。図示の画像に

は、輝度が高い領域の内側と外側とに、それぞれ輝度が低い領域との境界が形成されている。これにより、図中で、輝度の高い領域は、一定の幅を有する環状の形状をなす。以下、図示の画像を閾値画像と記載、閾値画像における輝度の高い環状の領域を閾値領域と記載する。

[0128] ここで、閾値画像と、図25および図27に示した変換画像とを比較すると、図25に示した変換画像のフーリエ領域と、閾値画像における閾値領域との重なりは0.37（相対置）となる。また、図27に示した変換画像のフーリエ領域と、閾値画像における閾値領域との重なりは0.52（相対置）となる。

[0129] 上記のようにして、生きていることが判っている細胞と、死んでいることが判っている細胞とを複数観察することにより、変換画像のフーリエ領域と閾値画像の閾値領域との重なりが0.45の場合を閾値として、値が0.45以下の場合、観察対象の細胞が生きており、値が0.45よりも大きい場合は細胞が死んでいると判定し得ることが判った。このように、判定装置100において、核内のタンパク分布をCARS過程により可視化させた上で、数値処理により細胞核内のタンパクの非一様度を数値化することにより、予め定めた閾値との比較により、細胞の生死を判定して、細胞シートの品質を評価することができる。

[0130] 図29は、生物細胞の細胞核におけるタンパク質の一様性に関する情報を示す情報画像の他の例を示す図である。図示の情報画像301は、次のようにして得られた。

[0131] まず、細胞が生きていることが予め判っている生物細胞を、判定装置100にサンプル101として装填し、励起光を照射することによりサンプル101から発生したCARS光を検出部181で検出した。励起光は、サンプル101に含まれるタンパク質の分子でCARS光を発生する波長を選んだ。これにより、サンプル101におけるタンパク質の分布を反映した観察画像が得られた。

[0132] 次に、検出部181において得られた観察画像を、情報生成部182にお

いて処理した。情報生成部182においては、観察画像の輝度分布における 2σ を閾値として観察画像を2値化して、CARS光の輝度が高い領域を示す2値化画像を生成した。

[0133] また、判定装置100において、上記CARS光を発生させた波長とは異なる波長の照射光をサンプル101に照射した。この段階でサンプル101に照射した照射光の波長は、サンプル101に含まれるタンパク質、脂質等において非線形光学効果を生じない波長を選択した。よって、サンプル101からラマン散乱光は射出されなかった。

[0134] その代わりに、検出部181においては、サンプル101を透過した照射光を検出部181において検出することにより、サンプル101における屈折率分布を反映した観察画像が得られた。これにより、観察画像において、生物細胞の細胞核の輪郭を検出して、CARS光を検出した場合に、細胞核の内部で発生したCARS光を選別することができる。よって、判定の対象となる生物細胞の周辺に存在する水分子等に起因する非共鳴バックグラウンドの影響を減じて、評価対象となる生物細胞の細胞核に含まれるタンパク質を集中的に検出できる。

[0135] 次に、CARS光に由来する上記の2値画像と、非線形光学効果を生じない照射光により得られた輪郭画像とを重ねて、図29に示した情報画像301が得られた。情報画像301においては、細胞核領域302の輪郭と、CARS光の輝度が高い領域を輝点とする2値画像とが重なって示される。

[0136] 次に、情報生成部182は、情報画像におけるS/N比を改善する目的で、独立して存在する画素は除いて、2以上の複数の画素が連続した高輝度画素群の面積を計数する。図示の例では、図中に番号1～3を付した複数の高輝度画素群が、細胞核領域302の輪郭の内側に分布している。

[0137] 情報生成部182は、高輝度画素群1～3の面積を合計して、当該合計値が細胞核領域302全体の面積に対して占める割合を算出する。図示の例では、488ピクセルの画素に相当する大きさの細胞核において、高濃度のタンパク質領域であることを示す高輝度画素群は7ピクセルを占め、細胞核領

域302全体に対して占める割合は1.4%であった。算出された値は、サンプル101におけるタンパク質分布の一様性を数値化した情報として判定部183に渡される。

[0138] 図30は、生物細胞におけるタンパク質の一様性に関する情報を示す情報画像のまた他の例を示す図である。図示の情報画像303は、細胞が死んでいることが予め判っている生物細胞を、判定装置100にサンプル101として装填し、図29に示した情報画像301を得た方法と同じプロセスで得た情報画像303である。図示のように、情報画像303には、図中に番号1~3を付した複数の高輝度画素群が、細胞核領域304の輪郭の内側に分布している。

[0139] 情報生成部182は、情報画像303についても、高輝度画素群1~3の面積を合計して、当該合計値が細胞核領域304全体の面積に対して占める割合を算出する。図示の例では、578ピクセルの画素に相当する大きさの細胞核において、高輝度画素群は18ピクセルを占め、細胞核領域304全体に対して高輝度画素群が占める面積の割合は3.1%であった。算出された値は、サンプル101におけるタンパク質分布の一様性を数値化した情報として判定部183に渡される。

[0140] 同時に培養した複数の細胞シートのサンプル101について、上記の方法でタンパク質分布の一様性を数値化した情報を蓄積した上で、各サンプル101の生死の状態を、他の方法でも調べた。その結果、調べたサンプル101においては、算出した高輝度画素群の面積比が2.5%以下の場合には細胞が生きており、細胞核領域302の内側でタンパク質が分散して分布していることが判った。また、算出した高輝度画素群の面積比が2.5%を超える場合は、細胞が死んでいて、細胞核領域302の内側でタンパク質が凝集していることが判った。よって、判定装置100における判定部183は、2.5%の閾値を設定して算出された面積比と比較することにより、算出値が当該閾値を超える場合は判定対象となる細胞が死んでおり、算出値が当該閾値を超えない場合は判定対象となる細胞が生きていると判定できる。

- [0141] なお、上記の例では、高輝度画素群の面積が細胞核において占める割合を、タンパク質の分布の一様性を示す情報として利用した。しかしながら、例えば、単位面積当たりの高輝度画素群の数、高輝度画素群の個々の形状等を、一様性を示す情報として使用してもよい。更に、複数種類の情報を組み合わせて、細胞の状態を判定してもよい。
- [0142] このように、生細胞においては、細胞核に対する高輝度画素群の面積比に基づくタンパク質の一様性を示す数値が小さい。一方、死細胞においては、上記数値が大きい。よって、生死の状態が予め判っているサンプル101を観察することにより、細胞の生死を判定する場合の閾値を決定して、未知の細胞に対する生死の状態の判定を自動化できる。これにより、細胞シート等の品質評価を自動化できる。
- [0143] なお、上記の例では、サンプル101内のタンパク質、脂質等を励起しない照射光により細胞核領域302、304の輪郭を検出した。しかしながら、既に説明したように、サンプル101内の脂質において非線形光学効果を生じさせる波長の励起光を照射して、タンパク質によるラマン散乱光と、脂質によるラマン散乱光との差分により細胞核領域302、304の輪郭を検出してもよい。
- [0144] 図31は、細胞シートを製造する製造装置200のブロック図である。即ち、上記した一連の判定方法を実行する判定装置100を組み込んで、細胞シートを製造する製造装置200を形成できる。製造装置200は、搬送部210、搬入・搬出部220、用意部230、培養部240、および判定部250を備える。
- [0145] 搬送部210は、気密な筐体212と、筐体212の内部に配された搬送ロボット214とを有する。筐体212の側壁は多角形をなす。
- [0146] 搬入・搬出部220、用意部230、培養部240、および判定部250は、搬送部210の側壁の各面に気密に結合され、各々内部が搬送部210の内部に連通する。これにより、搬送ロボット214は、搬入・搬出部220、用意部230、培養部240、および判定部250相互の間で、汚染さ

れることなく培養容器300を搬送できる。

- [0147] 搬入・搬出部220は、細胞シートの原料となる細胞株を採取する検体、未使用の培養容器、培養に用いる培養液、酸素ガス等の資材を搬入する場合、および、製造された細胞シートを搬出する場合に用いられる。換言すれば、搬入・搬出部220は、製造装置200の内部を外部環境から遮断して、資材および細胞シートの汚染を防止する。なお、搬入・搬出部220に洗浄装置を設けて、搬入・搬出部220において搬入された資材を清浄にしてもよい。
- [0148] 用意部230は、搬入された検体から、細胞シートとなる細胞株を単離する機材を備える。細胞株の単離は、用意部230に組み込まれたグローブボックスにおいてマニュアル操作してもよいし、大量の細胞シートを製造する場合は自動化してもよい。
- [0149] 培養部240は、培養する細胞株を収容した培養容器300の培養環境を維持する。培養環境として維持する項目としては、例えば、雰囲気温度、湿度、二酸化炭素濃度等が例示できる。また、培養部240は、培養液、酸素ガス等を培養容器に循環させると共に、培養の過程で使用された培地、培養液、洗浄液等を回収する廃物、廃液タンクも備える。更に、培養部240は、細胞シートの培養状態を製造装置200の外部から観察するカメラ等も備える。
- [0150] 判定部250は、図1に示した判定装置100を備え、更に、判定装置100に培養容器300を装填するマニピュレータ、判定装置100を製造装置200の外部から操作する遠隔操作部等を備える。
- [0151] なお、製造装置200の搬送部210には、更に他の部材を結合することもできる。例えば、培養された複数の細胞シートを積層して、多層細胞シートを作製する積層部を、搬送部210に結合することにより、細胞シートの培養から多層細胞シートの製造までを、製造装置200から細胞シートを取り出すことなく一貫して実行できる。
- [0152] 図32は、上記の製造装置200を用いて細胞シートを製造する手順を示

す流れ図である。なお、製造装置 200 を稼働させる場合は、搬送部 210、搬入・搬出部 220、用意部 230、培養部 240、および判定部 250 が予め気密に結合された上で、内部が滅菌されているものとする。

[0153] 細胞シートを製造する場合は、まず、培養容器、培地、検体、培養液等の資材を用意して、搬入・搬出部 220 から製造装置 200 に装入する（ステップ S201）。次に、搬入された検体を搬送部 210 により用意部 230 に搬送して、搬入された検体から、細胞シートとなる細胞株を単離する（ステップ S202）。

[0154] 次に、単離した細胞株に培養用培地を添加して適切な細胞濃度の細胞懸濁液を調製し、培養容器 300 に播種する（ステップ S203）。この段階で、細胞懸濁液の細胞の状態を判定し、例えば、死細胞の含有量が多く、培養の見込みが少ない検体は取り除いてもよい。

[0155] 次に、調製された培養検体を、搬送部 210 により培養部 240 に搬送して、細胞シートの培養を開始する。培養部 240 においては、雰囲気温度、湿度等を予め定めた範囲に維持すると共に、培養容器 300 内を絶えずガス交換して、培養環境の酸素濃度、二酸化炭素濃度等を予め定めた範囲に維持する（ステップ S204）。また、培養検体の培地を定期的に交換して、細胞シートの培養を促進する（ステップ S205）。

[0156] 更に、培養検体を培養しつつ、培養容器 300 がコンフルエントになったか否かを定期的に検査する（ステップ S206）。培養容器 300 がコンフルエントになっていない場合は（ステップ S206：NO）、コンフルエントになるまで培養を継続する。

[0157] 一方、コンフルエントになった培養容器 300 は、培養を終了して、搬送部 210 により判定部 250 に搬送され、培養された細胞シートの品質が判定される（ステップ S207）。なお、コンフルエントになった細胞は著しく増殖能が低下するので、継代培養をする場合は、培養容器 300 がコンフルエントになる前に培養部 240 から搬出することが好ましい。

[0158] 培養した検体を判定した結果、培養検体の状態が、予め定めた品質よりも

低い場合（ステップS208：NO）、当該検体は細胞シートとして使用されずに破棄される。細胞シートの品質は、例えば、判定部250に設けられた判定装置100を用いて判定できる。品質の判定は、例えば、当該細胞シートに含まれる生細胞または死細胞の数または割合により評価してもよい。また、判定段階では死んでいなくても、死につつある細胞の数または割合も、細胞シートを判定する指標のひとつとなり得る。

[0159] 培養した検体を判定した結果、培養検体の状態が、予め定めた品質よりも高い場合（ステップS208：YES）、当該検体を収容した培養容器は封止され（ステップS209）、搬送部210および搬入・搬出部220を通じて、製造装置200から搬出される（ステップS210）。完成した細胞シートとして使用されずに破棄される。細胞シートの品質は、例えば、培養された細胞シートに含まれる死細胞の多寡により判定される。

[0160] 上記のように、製造装置200を用いて細胞シートを製造することにより、資材の搬入から容器に封止された細胞シートの搬出まで、細胞シートを外部環境に曝すことなく完遂できる。よって、外部からの細胞シートの汚染と、細胞シートによる作業者の汚染と併せて防止できる。

[0161] また、死細胞が少ない、あるいは、生細胞が多く含まれた高品質な細胞シートを効率よく製造できる。なお、上記製造装置200において、培養検体に対する判定は、ステップS204～206の培養の前後に限られず、培養途中の各段階に、繰り返し判定してもよい。これにより、培養中に培養検体の品質が劣化したと判定された場合は、当該培養検体を破棄して、製造装置200のハードウェア資源を、他の細胞シートの培養に転用することができる。

[0162] 図36は、CARS過程等の非線形光学効果により生じたラマン散乱光により細胞の状態を判定する過程を模式的に示す図である。図36に示す手順は、図1におけるステップS108から109に対応する。また、図36においては、ラマン散乱光から得られた画像により、サンプル101に含まれる細胞の生死に関する状態を判定する各手順の内容を示す。

- [0163] 図示の手順で細胞の状態を判定する場合は、まず、例えば、タンパク質を対象とするCARS過程により、タンパク質に由来するラマン散乱光を発生させてタンパク質観察画像310を形成する(ステップS301)。当該観察画像を二値化処理等の画像処理することにより、タンパク質観察画像310において細胞核が占める細胞核領域311を直接に検出できる(ステップS302)。
- [0164] サンプル101中の各細胞において、細胞核の内部にはタンパク質が局在し、脂質はタンパク質に比べて極めて少ない。よって、タンパク質を対象としたCARS過程により発生したラマン散乱光から得られたタンパク質観察画像310の一部を形成する非共鳴バックグラウンドは、少なくとも細胞核領域311においては、ノイズではなくタンパク質由来の情報と見做すことができる。
- [0165] そこで、例えば、図36に示すタンパク質観察画像310において、それ自体もタンパク質により形成された核内構造体の一つである核小体を検出できる。核小体は、図中では細胞核領域311内に白く見えている。よって、細胞核領域311における核内での核小体の占有率、面積、大きさおよび形状のうちの少なくともひとつ検出して、予め定めた閾値と比較することにより、当該細胞の状態を判定できる(ステップS303)。閾値は、染色試薬による染色に基づいて生きていること、または、死んでいることが判っているサンプル101から得られた値に基づいて、予め定めておく。このように、ステップS301から303の少ないステップ数で細胞の生死に関する状態を判定できる。得られたタンパク質観察画像310の品質が高い場合は特に有効である。
- [0166] 一方、タンパク質観察画像310から細胞核領域311を検出することが難しい場合は、ステップS301に続いて、例えば脂質を対象とするCARS過程により、脂質に由来するラマン散乱光を発生させて脂質観察画像320を形成する(ステップS304)。更に、得られた脂質観察画像320と、ステップS301で得られたタンパク質観察画像310との差分による差

分画像330を生成する（ステップS305）。

[0167] 細胞において、タンパク質と脂質とは排他的に存在する。よって、上記の差分画像330からは、非共鳴バックグラウンド信号の影響を排除した細胞核領域331を検出できる（ステップS306）。次に、前記したタンパク質観察画像310において、差分画像330から検出した細胞核領域331を特定することにより、タンパク質観察画像310に基づいて、サンプル101における細胞の状態を判定できる（ステップS307）。

[0168] なお、ステップS306において検出した細胞核領域331により、差分画像330自体の細胞核領域331におけるタンパク質の一様性に基づいて、サンプル101における細胞の状態を判定してもよい。このように、判定までのステップ数は増加するものの、サンプル101の状態、顕微鏡の性能等に応じて、判定の手順を調整してもよい。

[0169] 図36では、上記した実施例で細胞核内のタンパク質の一様性を示す数値が閾値よりも小さい細胞すなわち生細胞に対して状態を判定した例を示した。図37は、図36に示した同じ手順によるサンプル101の状態判定を、一様性を示す数値が閾値よりも大きい細胞すなわち死細胞を含むサンプル101に対して実施した場合の例を示す図である。実行した手順は、図36に示した場合と同じであるが、ステップS303およびステップS307において、タンパク質観察画像310の細胞核領域311、331において、核小体の形状、大きさ等が、図36のタンパク質観察画像310に表示されている生細胞の核小体に比べて、顕著に変化していることが判る。また、ステップS408における差分画像330においても、タンパク質の一様性が崩れ、細胞核領域331の中央付近に偏在していることが判る。

[0170] 上記した実施の形態では、検査対象としている細胞種が筋芽細胞である例を示したが、筋芽細胞以外の細胞種を検査対象としてもよい。この場合、細胞の状態判定のための閾値は細胞種ごとに設定する。

[0171] また、細胞の死因がアポトーシスである場合、死亡して間もない初期段階では細胞膜は破壊されておらず、細胞膜の表面にタンパク質が現れることが

ある。この場合、細胞膜の表面に現れたタンパク質は染色試薬で染色できるため、細胞核内のタンパク質の分布と表面のタンパク質の分布との関連性を予め記憶しておくことにより、細胞膜の表面のタンパク質の状態に基づいて細胞の状態を判定することができる。この場合、細胞が死亡している状態に初期段階も含まれる。

[0172] 更に、上記した実施の形態では、二次元空間内でのタンパク質の一様性に基づいて細胞の状態を判定する例を示したが、例えば、一つの細胞核に対して複数の高さ位置で二次元画像を取得し、それらの画像に基づいて細胞核内におけるタンパク質の三次元的な一様性を検出し、これに基づいて細胞の状態を判定してもよい。

[0173] 以上、本発明を実施の形態を用いて説明したが、本発明の技術的範囲は上記実施の形態に記載の範囲には限定されない。上記実施の形態に、多様な変更または改良を加えることが可能であることが当業者に明らかである。その様な変更または改良を加えた形態も本発明の技術的範囲に含まれ得ることが、請求の範囲の記載から明らかである。

[0174] 請求の範囲、明細書、および図面中において示した装置、システム、プログラム、および方法における動作、手順、ステップ、および段階等の各処理の実行順序は、特段「より前に」、「先立って」等と明示しておらず、また、前の処理の出力を後の処理で用いるのでない限り、任意の順序で実現しうることに留意すべきである。請求の範囲、明細書、および図面中の動作フローに関して、便宜上「まず、」、「次に、」等を用いて説明したとしても、この順で実施することが必須であることを意味するものではない。

符号の説明

[0175] 100 判定装置、101 サンプル、102 スライドガラス、103 スペーサ、104 カバーガラス、105 封止材、106 封入液、109 細胞シート、110 ステージ、111 ステージスキャナ、120 対物光学系、121 上側対物レンズ、122 下側対物レンズ、130 レーザ装置、131、132 レーザ光源、133 コンバイナ、140

励起部、141 ガルバノスキャナ、142 スキャンレンズ、143 一次像面、144、151 反射鏡、150 上側ラマン散乱光検出部、152、153、162、163 リレーレンズ、154、164 帯域通過フィルタ、155、165 光電子増倍管、160 下側ラマン散乱光検出部、161 ダイクロイックミラー、170 制御部、171 処理装置、172 マウス、173 キーボード、174 表示部、181 検出部、182 情報生成部、183 判定部、200 製造装置、210 搬送部、212 筐体、214 搬送ロボット、220 搬入・搬出部、230 用意部、240 培養部、250 判定部、300 培養容器、301、303 情報画像、302、304、311、331 細胞核領域、310 タンパク質観察画像、320 脂質観察画像、330 差分画像、401、402 光学顕微鏡写真

請求の範囲

- [請求項1] 励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された前記検出対象の一様性に関する情報を用いて、前記細胞の状態を判定する判定部を備える判定装置。
- [請求項2] 前記検出対象はタンパク質である請求項1に記載の判定装置。
- [請求項3] 前記情報を生成する情報生成部を備え、
前記情報生成部は、非共鳴バックグラウンド信号に対応する情報を取り除いた前記情報を生成する請求項1または請求項2に記載の判定装置。
- [請求項4] 前記情報生成部は、前記生物細胞における複数の位置で、前記検出対象の前記光強度と前記生物細胞に含まれる他の検出対象の前記光強度との差分に基づいて前記情報を生成する請求項3に記載の判定装置。
- [請求項5] 前記他の検出対象は脂質である請求項4に記載の判定装置。
- [請求項6] 前記情報生成部は、前記検出対象を含むサンプルにおける屈折率分布を反映した画像に基づいて、前記放射光を検出する範囲を示す情報を更に生成する請求項4に記載の判定装置。
- [請求項7] 前記判定部は、前記状態が予め判っている細胞の判定結果に基づいて決定された閾値に基づいて前記状態を判定する請求項3から6のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項8] 前記情報生成部は、前記情報を数値として生成し、
前記判定部は、数値により定義された閾値に基づいて、前記状態を判定する請求項3から7のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項9] 前記情報生成部は、前記放射光の最大強度と平均強度との強度比を生成し、
前記判定部は、前記強度比に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7または8に記載の判定装置。
- [請求項10] 前記情報生成部は、前記光強度のヒストグラムをガウスフィッティ

ングしたガウス関数を同定して、当該ガウス関数の予め定められた傾きとなる前記光強度までの度数の積算値を生成し、

前記判定部は、前記積算値に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から9のいずれか一項に記載の判定装置。

[請求項11]

前記情報生成部は、前記光強度のヒストグラムをガウスフィッティングしたガウス関数を同定して、同定したガウス関数のピーク位置となる前記光強度と、前記光強度の平均値との差分を生成し、

前記判定部は、前記差分に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から10のいずれか一項に記載の判定装置。

[請求項12]

前記情報生成部は、前記光強度のコントラスト評価値を生成し、

前記判定部は、前記コントラスト評価値に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から11のいずれか一項に記載の判定装置。

[請求項13]

前記情報生成部は、前記生物細胞のひとつの領域における放射光の光強度の最大値に対する最小値の比と、当該領域の周辺領域における放射光の光強度の最大値に対する最小値の比との平均値を、前記領域における前記コントラスト評価値とする請求項12に記載の判定装置。

[請求項14]

前記情報生成部は、前記光強度の度数を積算したローレンツ曲線を生成して、前記ローレンツ曲線と均等分配線との面積差を生成し、

前記判定部は、前記面積差に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から13のいずれか一項に記載の判定装置。

[請求項15]

前記情報生成部は、前記光強度を正規化した前記ローレンツ曲線を生成する請求項14に記載の判定装置。

[請求項16]

前記情報生成部は、前記光強度の分布に基づいて形成された2次元画像の予め定められた領域をフーリエ変換して、予め定められた周波数成分の割合を生成し、

前記判定部は、前記割合に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から15のいずれか一項に記載の判定装置。

- [請求項17] 前記情報生成部は、空間内の位置に対応付けられた前記光強度のそれぞれを、当該位置を含む予め定められた領域内に在る前記光強度との加重平均に置き換えて数値化した前記一様性を生成し、
前途判定部は、前記一様性に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から16のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項18] 前記情報生成部は、前記生物細胞に固まって存在する前記検出対象に対応して検出された高輝度領域の面積割合を生成し、
前記判定部は、前記面積割合に関する前記閾値に基づいて判定する請求項7から17のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項19] 前記情報生成部は、前記光強度の分布に基づいて形成された2次元画像を標準偏差 σ の2倍の範囲で2値化した2値化画像において、連続する高輝度画素が存在する領域の割合を前記面積割合とする請求項18に記載の判定装置。
- [請求項20] 前記放射光は、前記検出対象から放射されたアンチストークスラマン散乱光である請求項1から19のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項21] 前記光強度を検出する検出部を備え、
前記検出部は、前記細胞に対して非侵襲に得られた放射光の光強度を検出する請求項1から20のいずれか一項に記載の判定装置。
- [請求項22] 励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された前記検出対象の一様性に関する情報を用いて、前記細胞の状態を判定する判定ステップをプロセッサに実行させる判定プログラム。
- [請求項23] 励起光が照射された生物細胞に含まれる検出対象からの放射光の光強度に基づいて生成された前記検出対象の一様性に関する情報を用いて、前記細胞の状態を判定する判定段階を備える判定方法。
- [請求項24] 細胞を単離して細胞株を用意する用意部と、
前記細胞株を細胞シートに培養する培養部と、
請求項1から21までのいずれか一項に記載された判定装置と

を備える細胞シート製造装置。

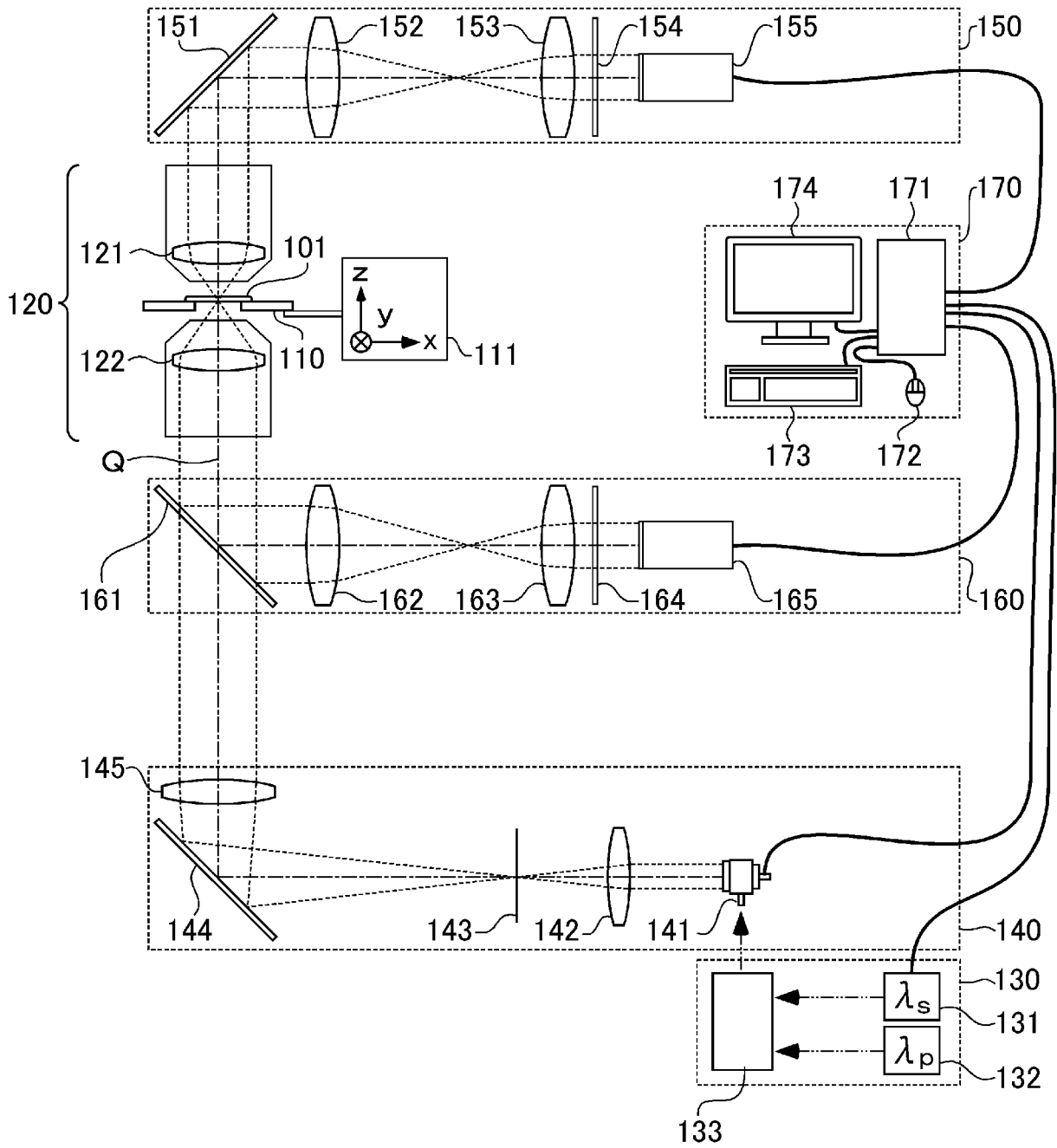
[請求項25] 前記判定装置は、前記細胞シートの良否を判定する請求項24に記載の細胞シート製造装置。

[請求項26] 細胞を単離して細胞株を用意する用意段階と、
前記細胞株を細胞シートに培養する培養段階と、
請求項1から21までのいずれか一項に記載された判定装置により
前記細胞の状態を判定する判定段階と
を備える細胞シート製造方法。

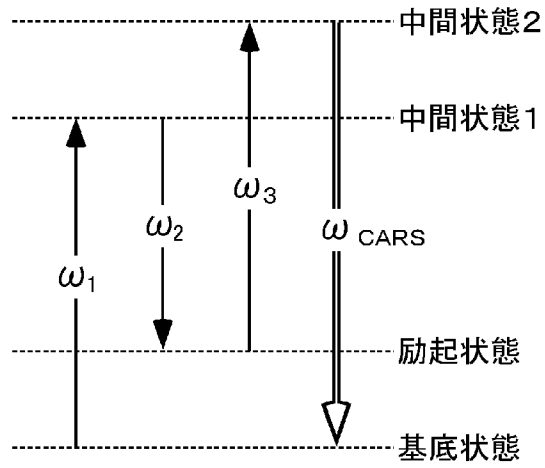
[請求項27] 前記判定段階は、前記細胞シートの良否を判定する段階を含む請求項26に記載の細胞シート製造方法。

[図1]

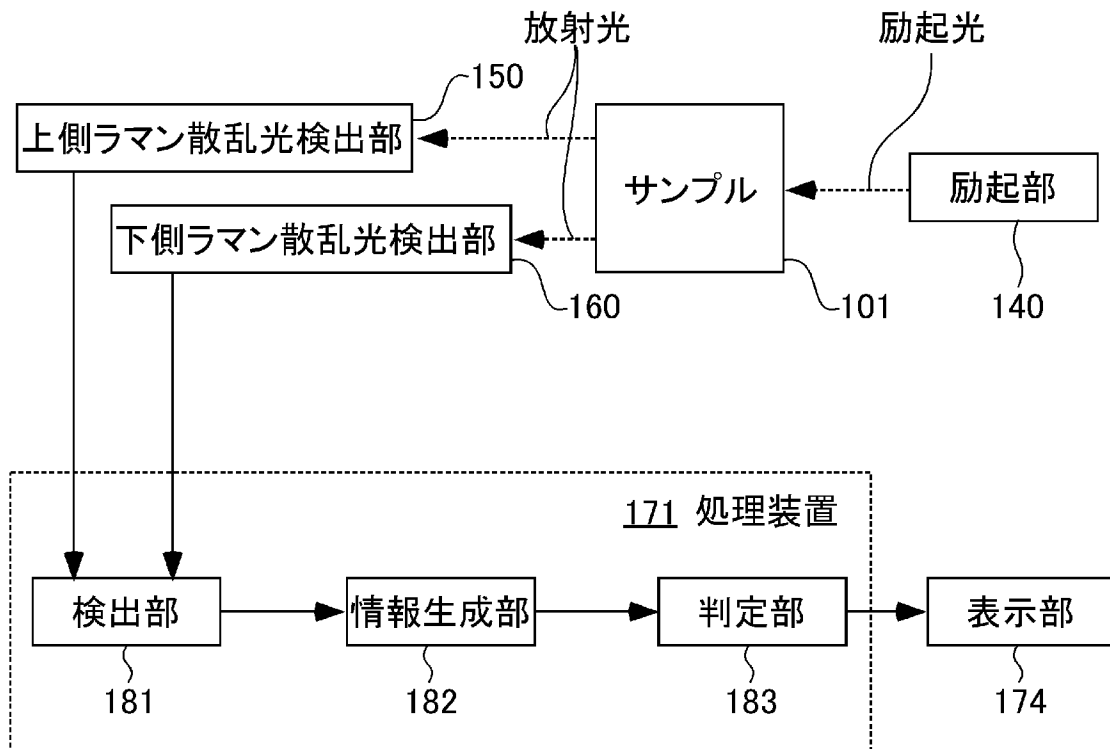
100



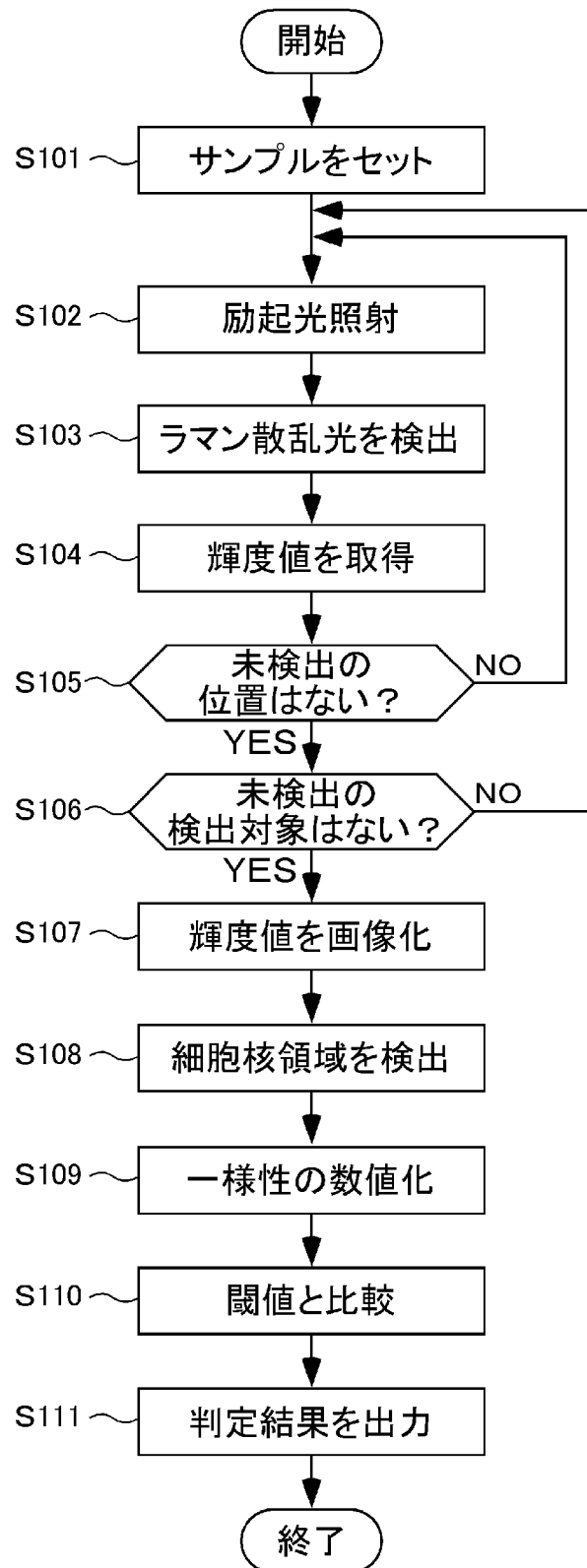
[図2]



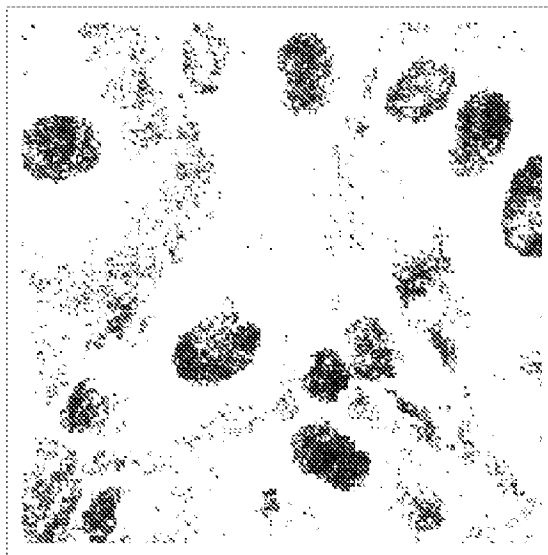
[図3]



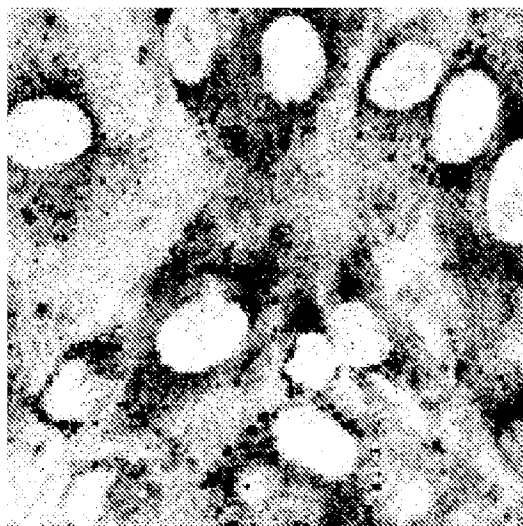
[図4]



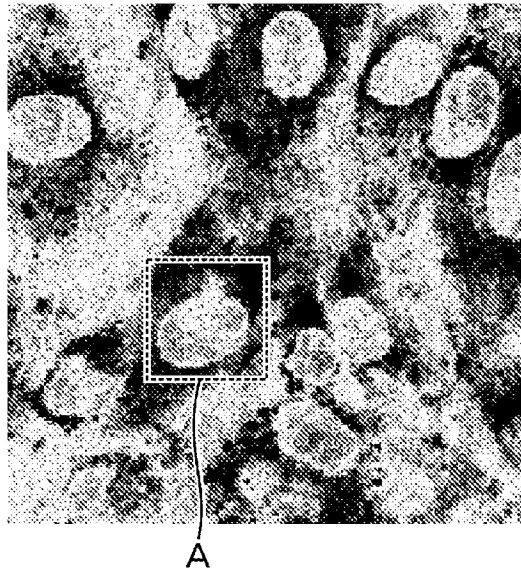
[図5]



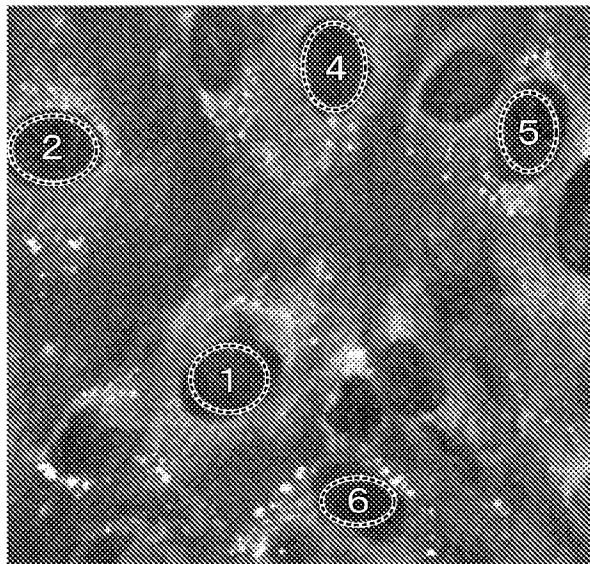
[図6]



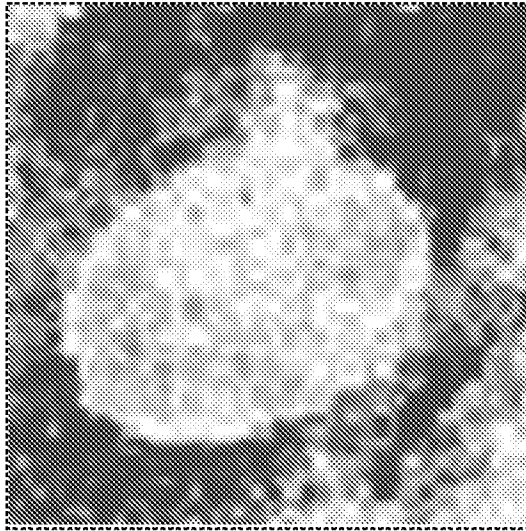
[図7]



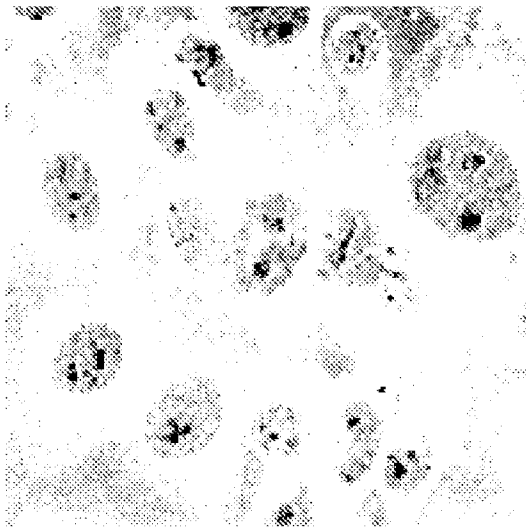
[図8]



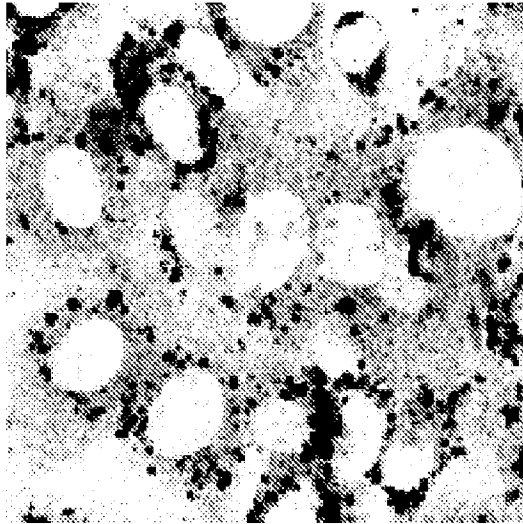
[図9]



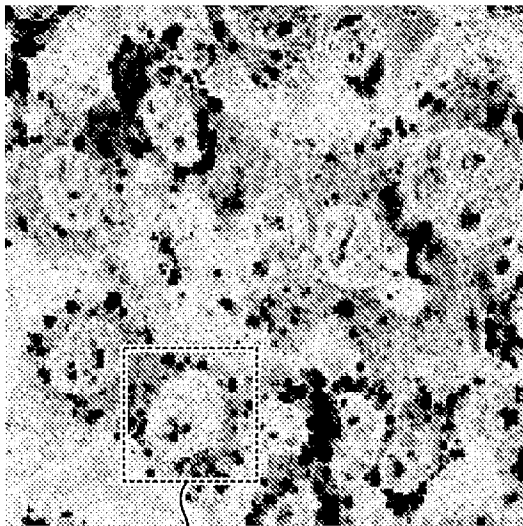
[図10]



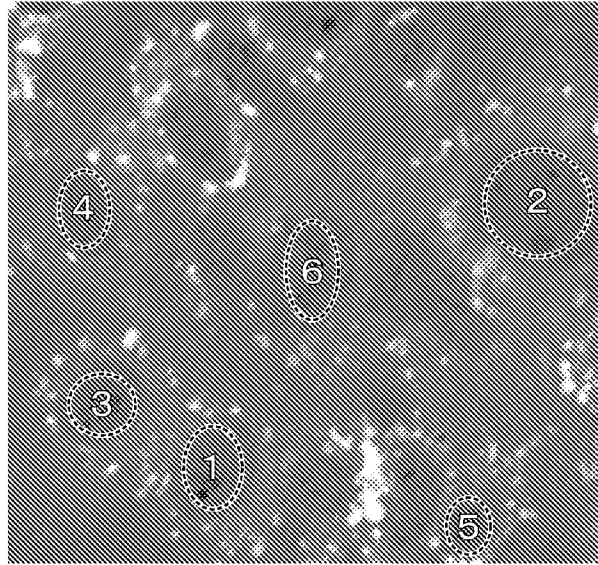
[図11]



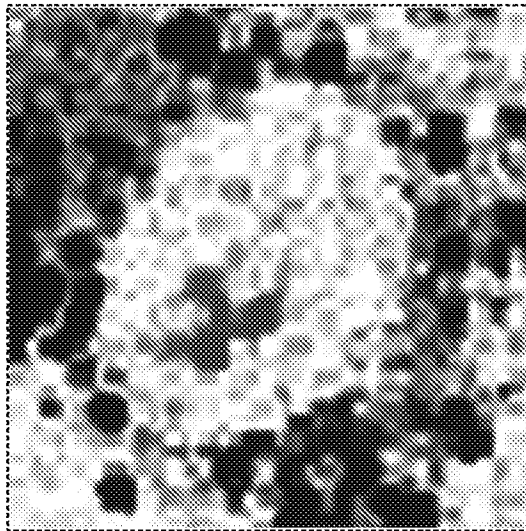
[図12]



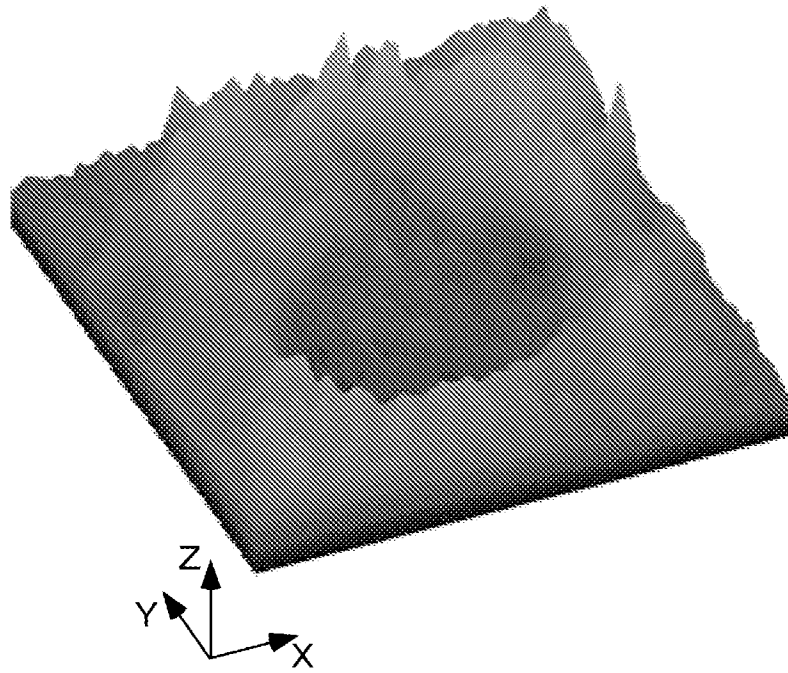
[図13]



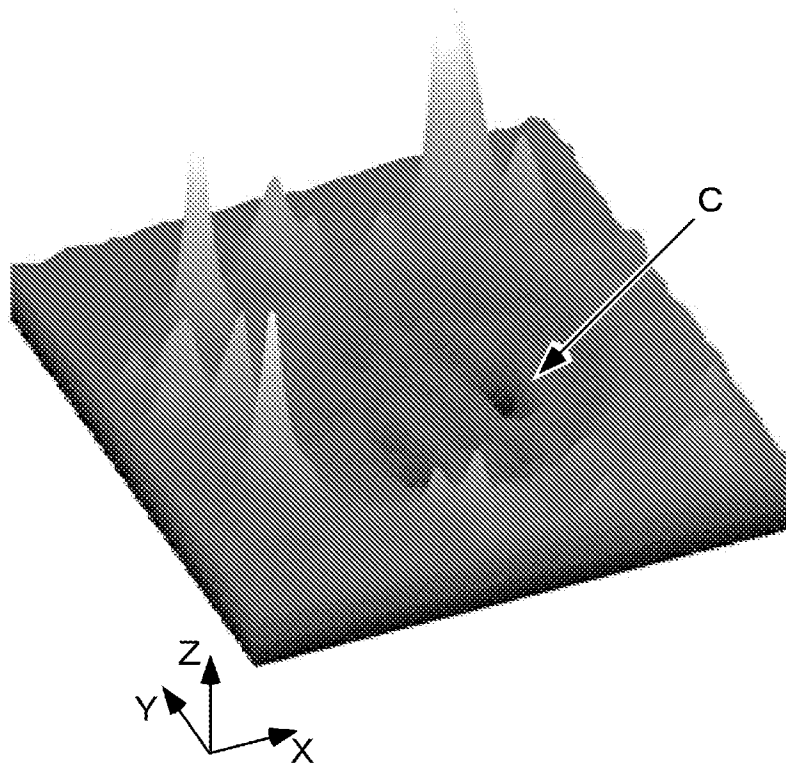
[図14]



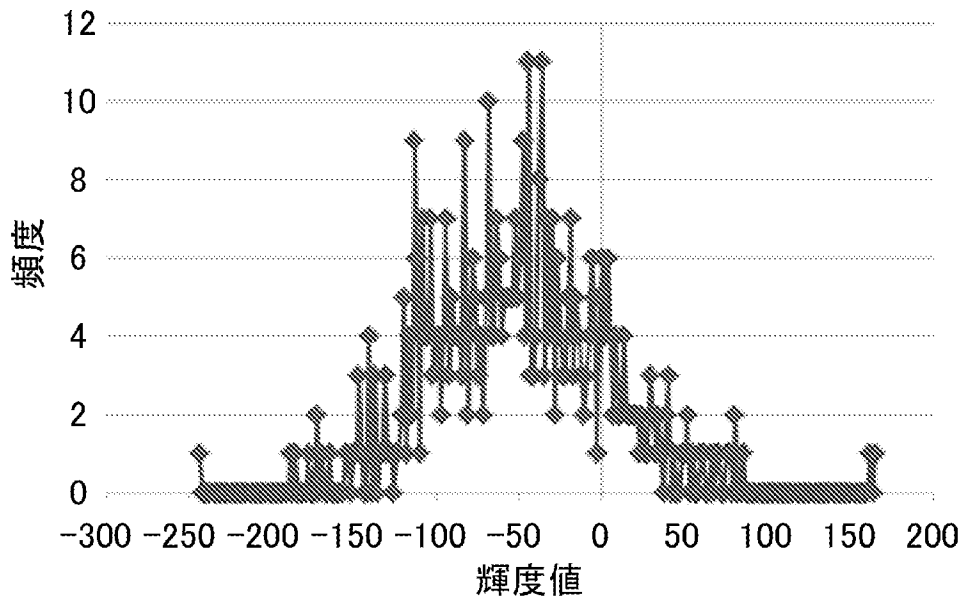
[図15]



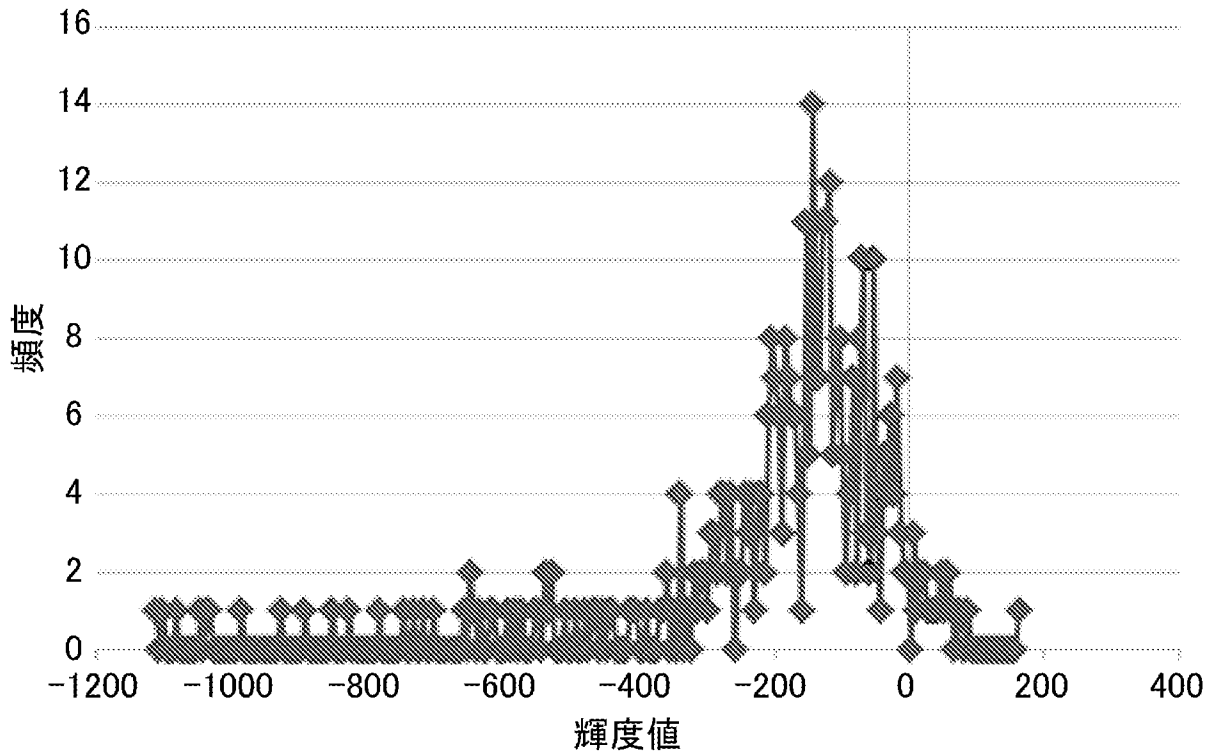
[図16]



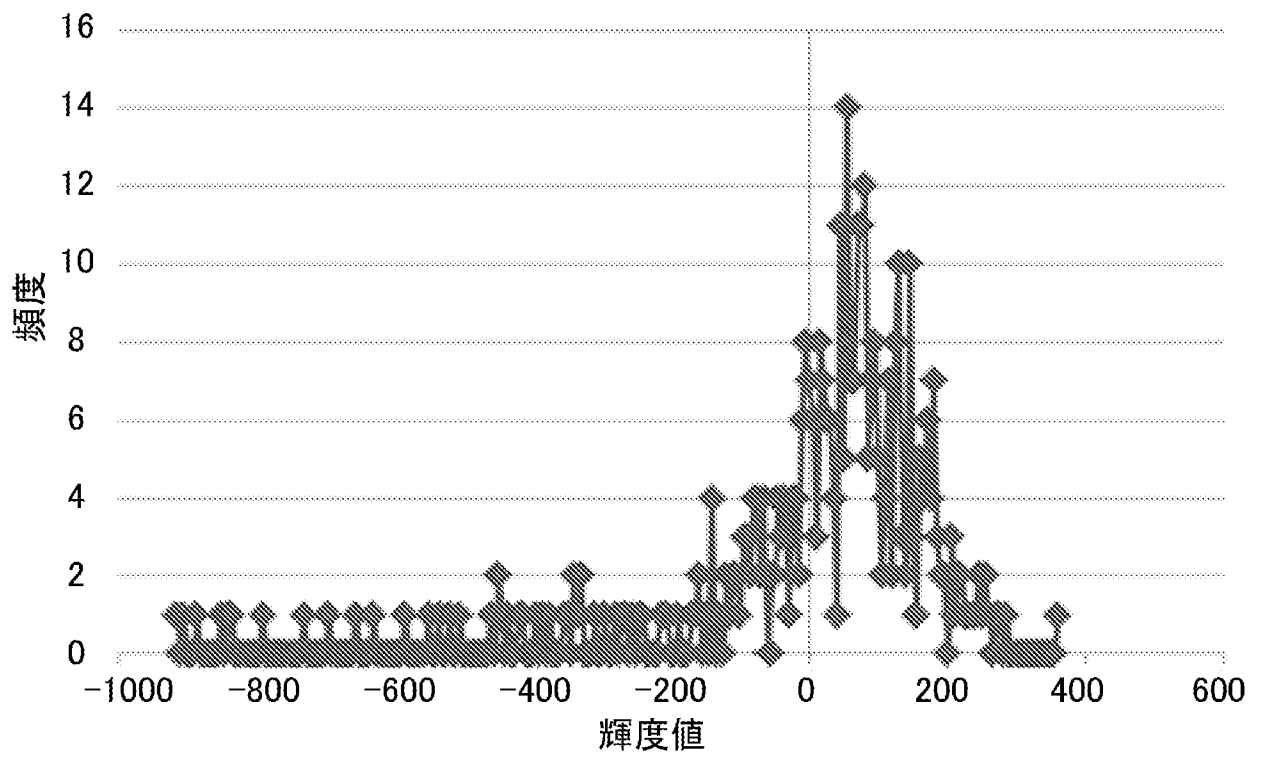
[図17]



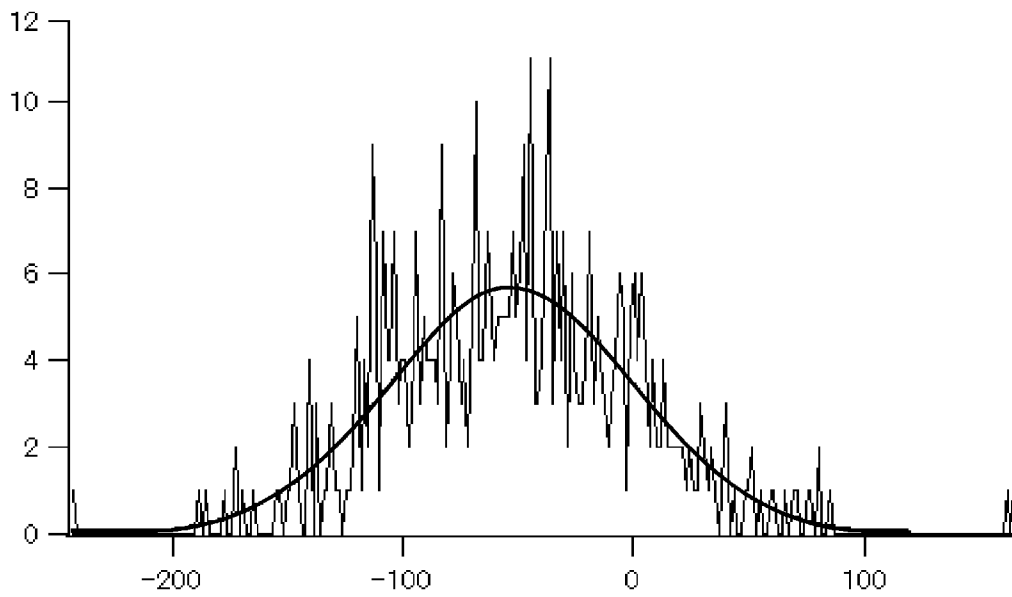
[図18]



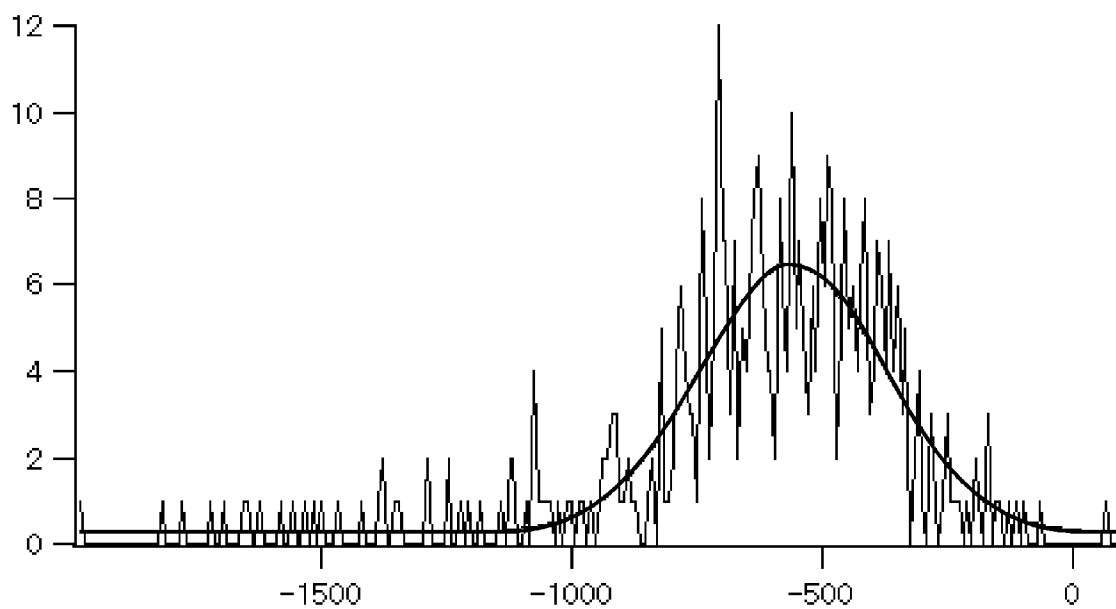
[図19]



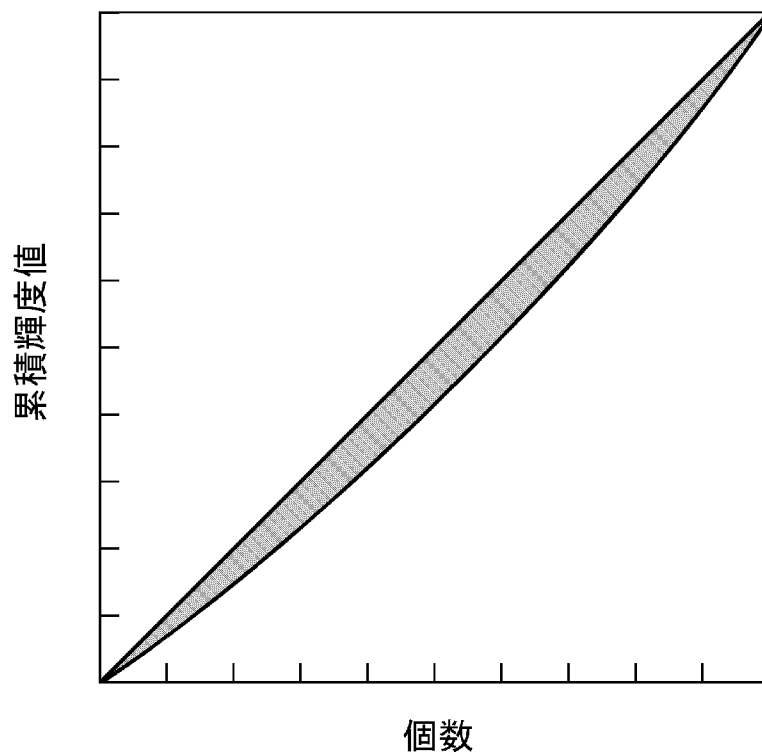
[図20]



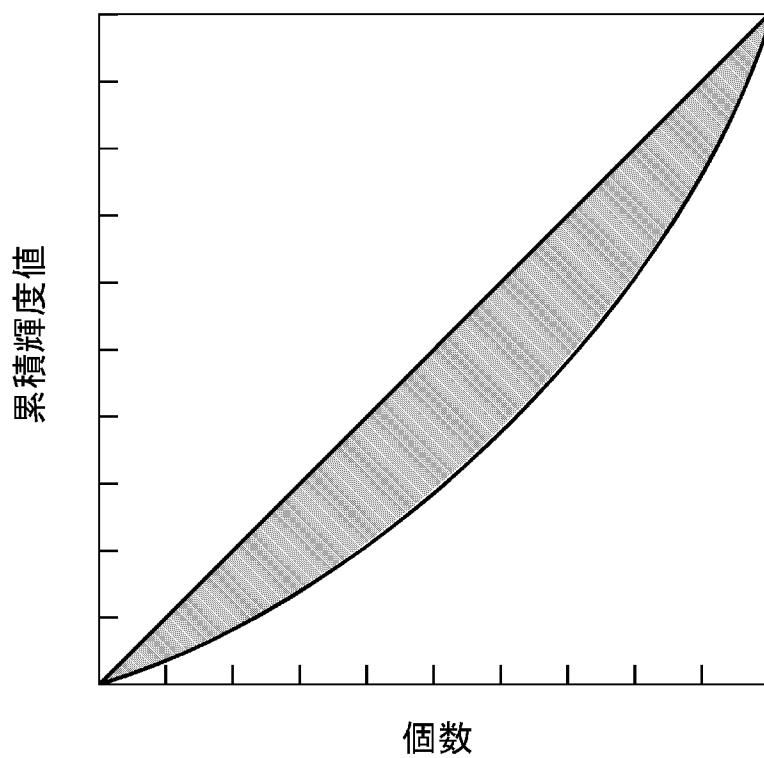
[図21]



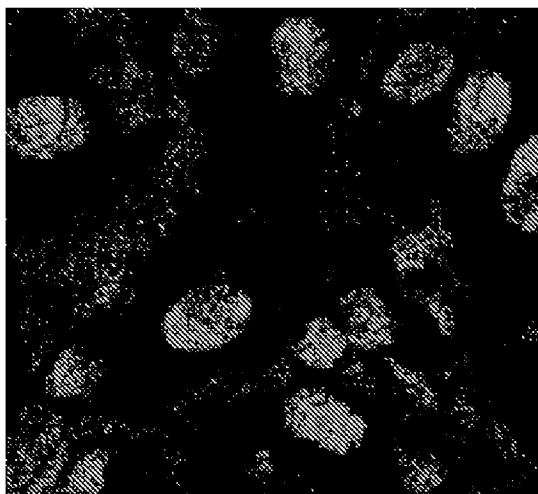
[図22]



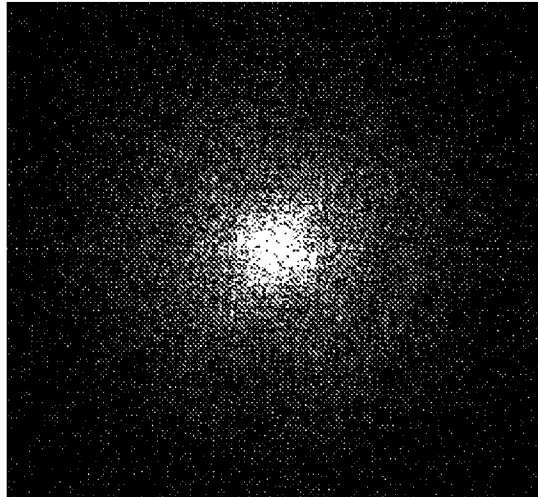
[図23]



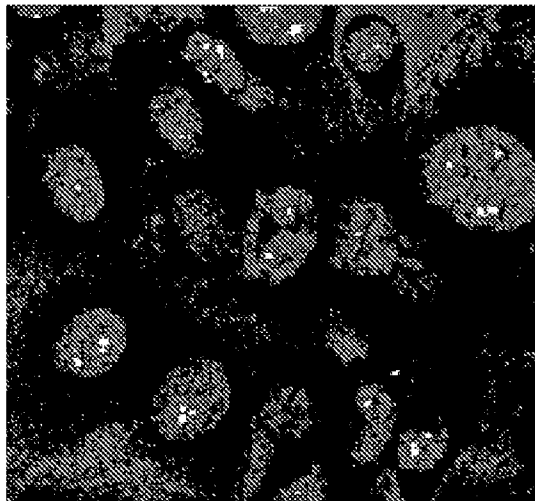
[図24]



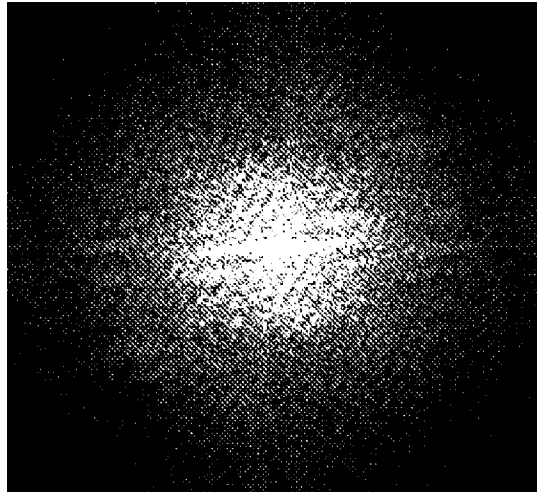
[図25]



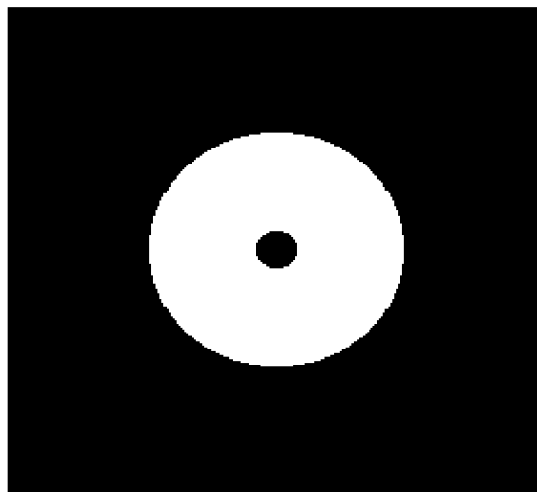
[図26]



[図27]

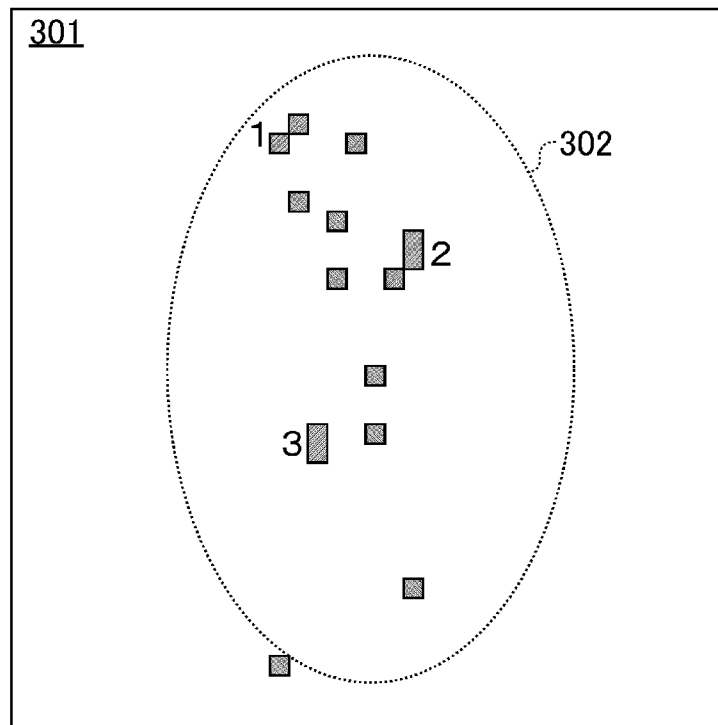


[図28]



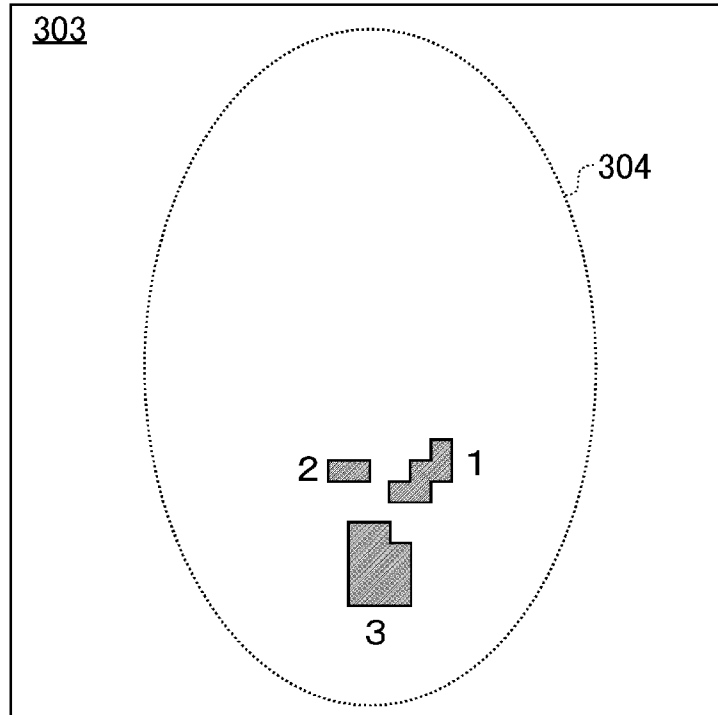
[図29]

生細胞

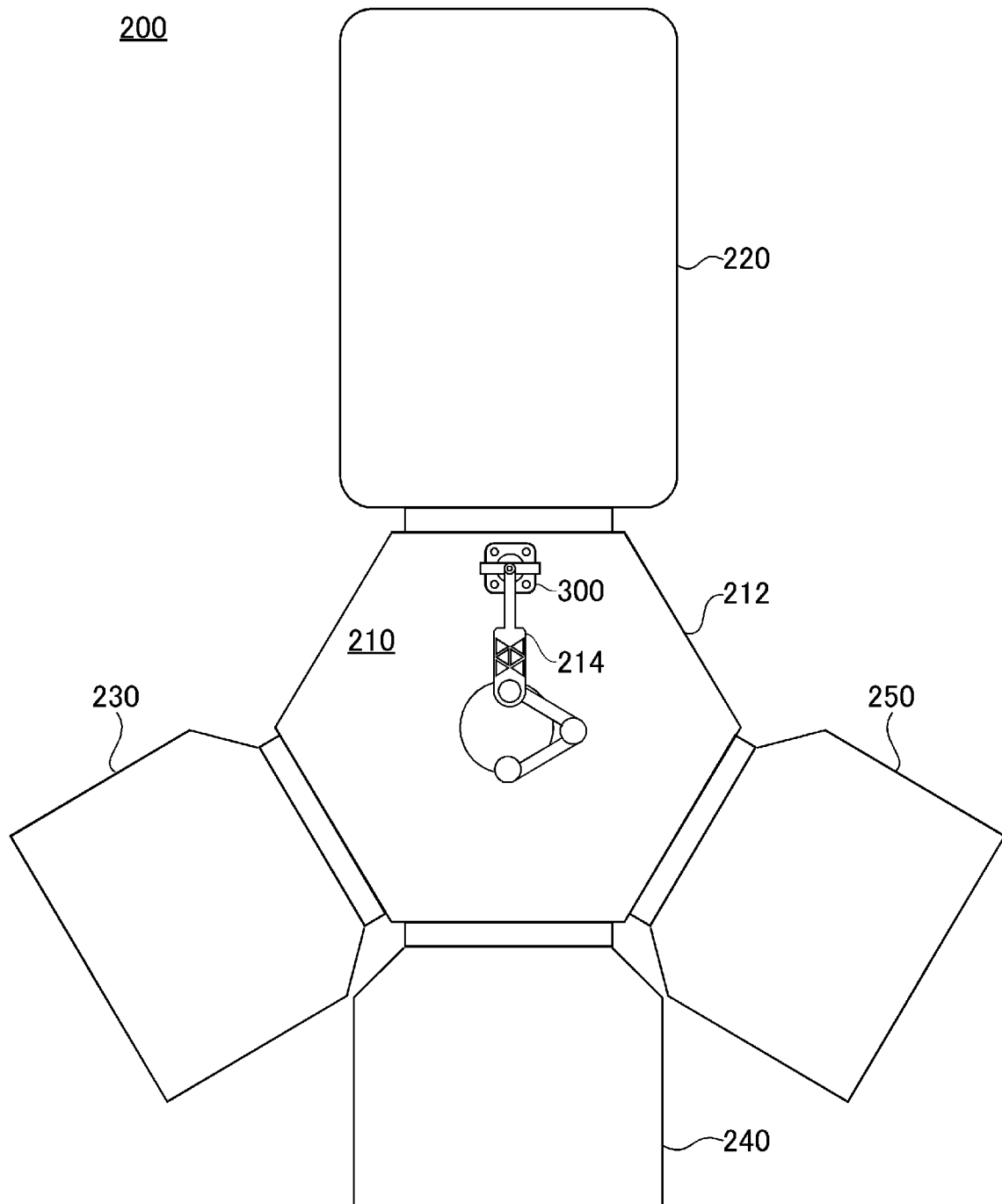


[図30]

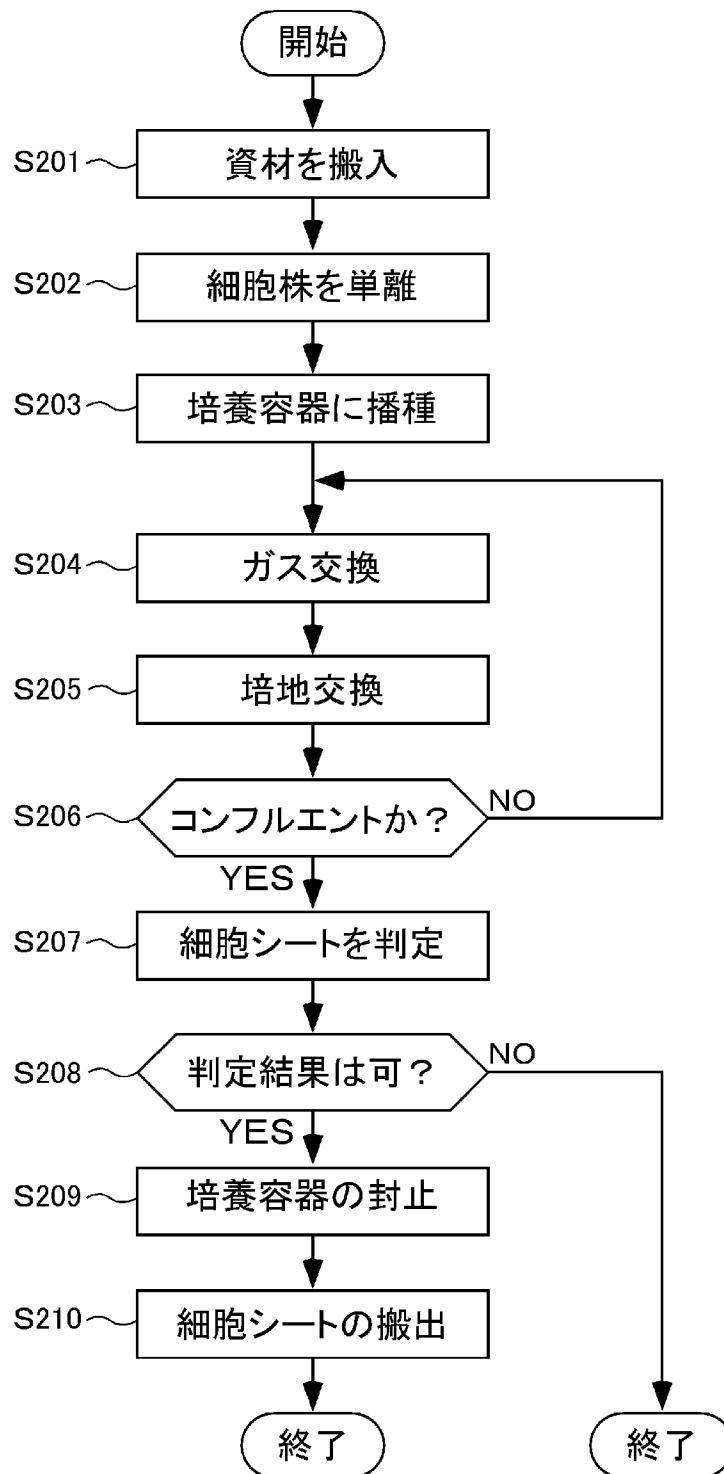
死細胞



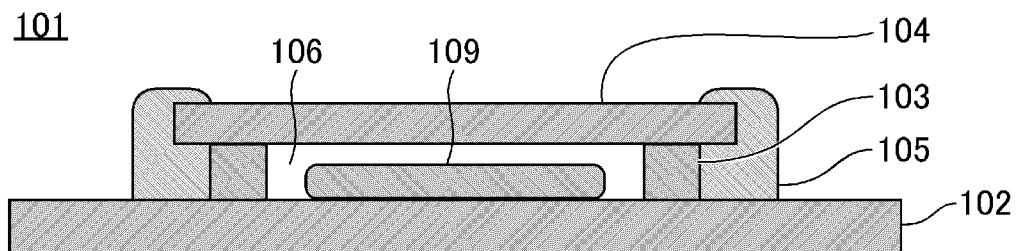
[図31]



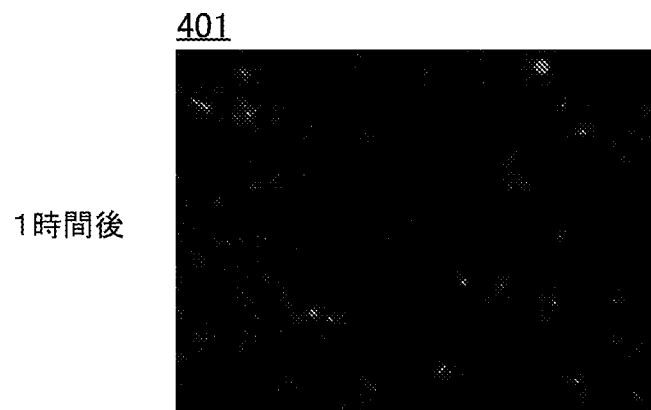
[図32]



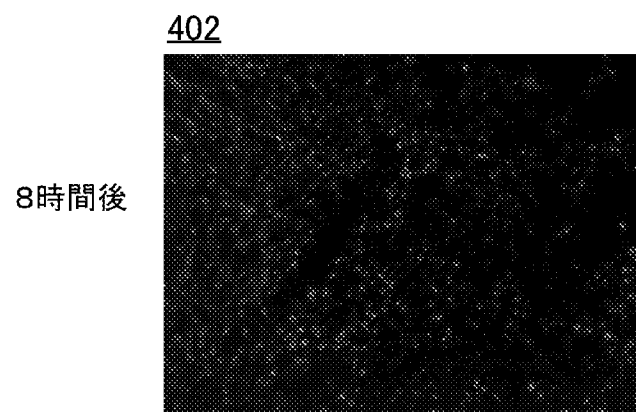
[図33]



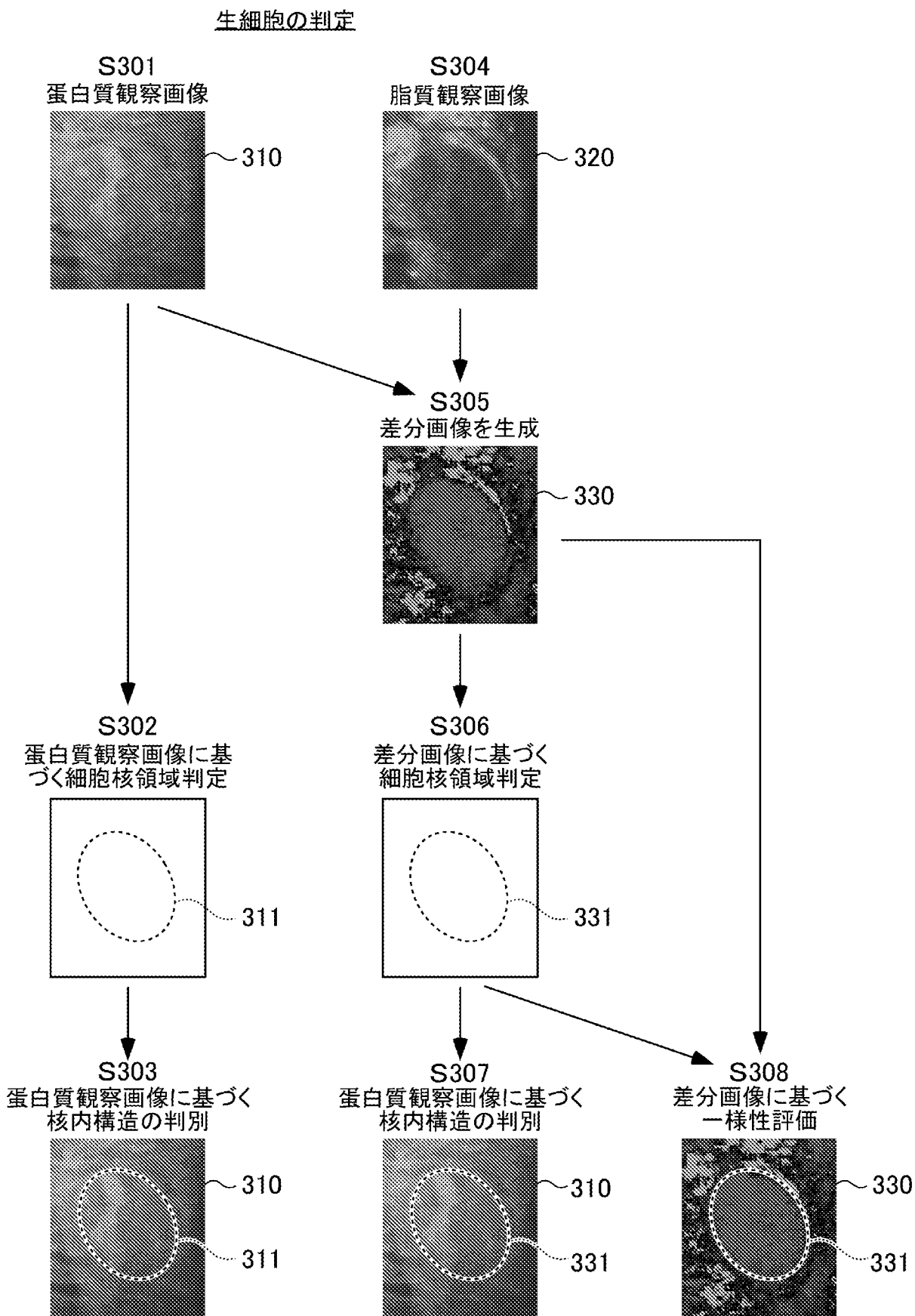
[図34]



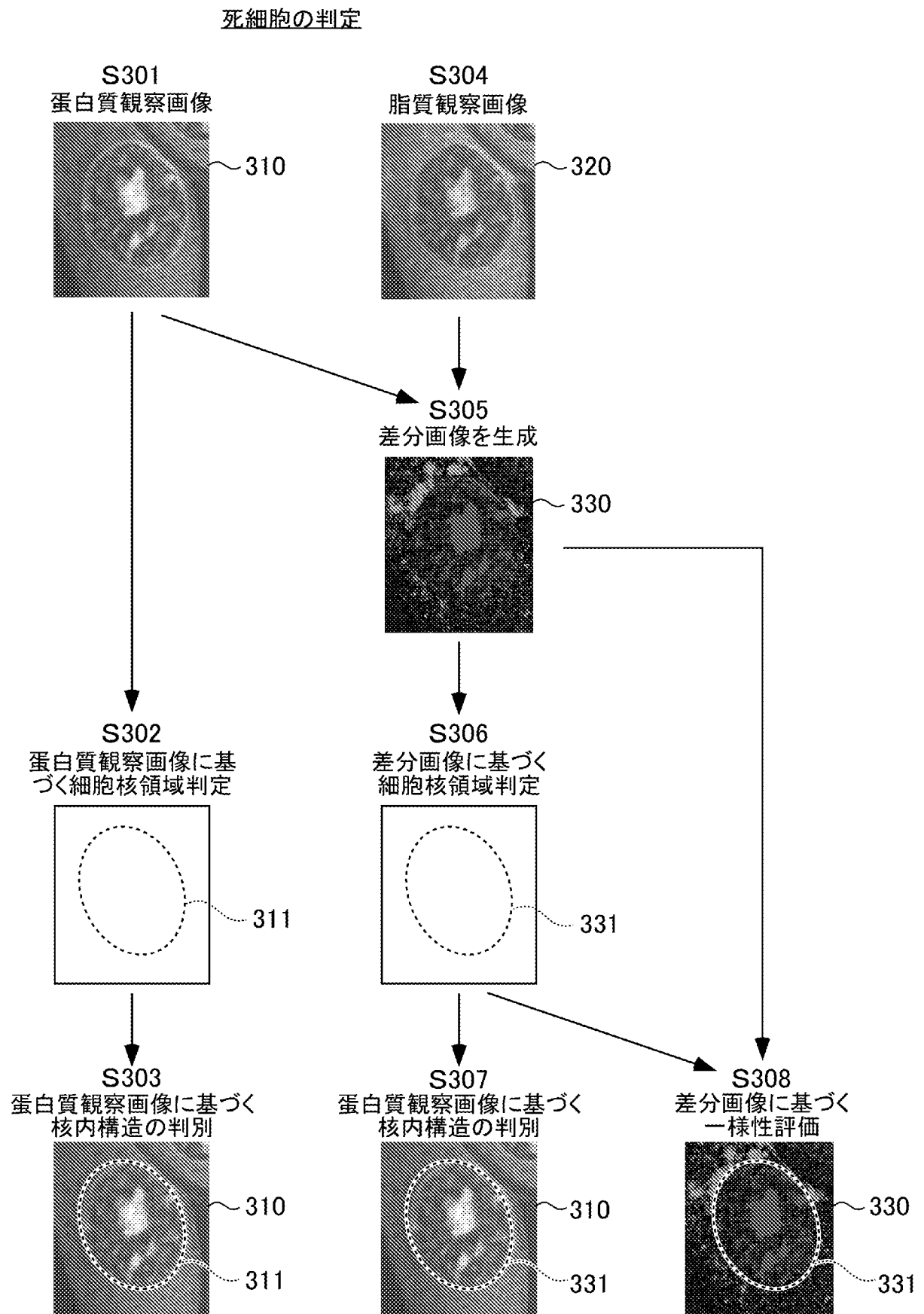
[図35]



[図36]



[図37]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/066510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/34(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CA/MEDLINE/BIOSIS(STN), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2014/162744 A1 (Nikon Corp.), 09 October 2014 (09.10.2014), claims; paragraphs [0003] to [0011], [0051] to [0053], [0056] to [0068], [0077], [0080], [0087] & US 2016/0103072 A1 claims; paragraphs [0008] to [0013], [0073] to [0075], [0078] to [0090], [0099], [0102], [0109] & EP 2982968 A1	1, 2, 20-27 3-21, 24-27
X Y	WO 2015/004917 A1 (Nikon Corp.), 15 January 2015 (15.01.2015), claims; paragraphs [0050], [0051], [0053], [0069], [0076], [0080], [0081] (Family: none)	1, 2, 20-27 3-21, 24-27

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 24 August 2016 (24.08.16)	Date of mailing of the international search report 06 September 2016 (06.09.16)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066510

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Katsumasa FUJITA, "Raman Sanranko o Mochiita Seitai Bunshi no Kenbi Kansatsu", edited by Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, Soshiki Saibo Kagaku, 2010, pages 101 to 109, page 106, right column, 12th line from the bottom to page 107, left column, 7th line from the bottom	3-21, 24-27
A	JP 2007-524833 A (The Regents of the University of Michigan), 30 August 2007 (30.08.2007), entire text & US 2005/0010130 A1 & US 2005/0119587 A1 & WO 2005/004714 A1 & WO 2006/036172 A1	10-21, 24-27
A	JP 2014-202550 A (Olympus Corp.), 27 October 2014 (27.10.2014), entire text (Family: none)	10-21, 24-27
A	WO 2013/069561 A1 (Hoya Corp.), 16 May 2013 (16.05.2013), entire text & JP 2013-122437 A	10-21, 24-27
P, X P, Y	Naoki FUKUTAKE et al., "Saibo Seishi Hantei ni Muketa CARS Kenbikyō ni yoru Hisenshoku Imaging", Regenerative Medicine, 01 February 2016 (01.02.2016), page 322, P-02-148, ISSN 1347-7919	1, 2, 20-23 3-19, 24-27
A	MINAMIKAWA, T. et al., Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti-stokes raman scattering microscopy, Journal of Biomedical Optics, 2011, Vol.16, No.2, pages 021111-1 - 021111-5, ISSN 1083-3668, E-ISSN 1560-2281	1-27

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/34(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/34											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">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>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016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	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2016年										
日本国実用新案登録公報	1996-2016年										
日本国登録実用新案公報	1994-2016年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CA/MEDLINE/BIOSIS (STN)、PubMed、CiNii											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	WO 2014/162744 A1 (株式会社ニコン) 2014.10.09, 特許請求の範囲, 段落0003~0011, 0051~0053, 0056~0068, 0077, 0080, 0087 & US 2016/0103072 A1, 特許請求の範囲, 段落0008~0013, 0073~0075, 0078~0090, 0099, 0102, 0109, & EP 2982968 A1	1, 2, 20-27 3-21, 24-27									
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 24.08.2016		国際調査報告の発送日 06.09.2016									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 白井 美香保	4N 4502								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3488								

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
X Y	WO 2015/004917 A1 (株式会社ニコン) 2015.01.15, 特許請求の範囲, 段落0050, 0051, 0053, 0069, 0076, 0080, 0081 (ファミリーなし)	1, 2, 20-27 3-21, 24-27
Y	藤田 克昌, ラマン散乱光を用いた生体分子の顕微観察, 日本組織 細胞化学会編 組織細胞化学, 2010, pages 101-109, 第106頁右 欄下から第12行~第107頁左欄下から第7行	3-21, 24-27
A	JP 2007-524833 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテイ オブ ミシガン) 2007.08.30, 全文 & US 2005/0010130 A1 & US 2005/0119587 A1 & WO 2005/004714 A1 & WO 2006/036172 A1	10-21, 24-27
A	JP 2014-202550 A (オリンパス株式会社) 2014.10.27, 全文 (ファミリーなし)	10-21, 24-27
A	WO 2013/069561 A1 (HOYA株式会社) 2013.05.16, 全文 & JP 2013-122437 A	10-21, 24-27
P, X P, Y	福武 直樹, 他, 細胞生死判定に向けたCARS顕微鏡による非染色 イメージング, 日本再生医療学会雑誌 再生医療, 2016.02.01, page 322, P-02-148, ISSN 1347-7919	1, 2, 20-23 3-19, 24-27
A	MINAMIKAWA, T. et al., Real-time imaging of laser-induced membrane disruption of a living cell observed with multifocus coherent anti-stokes raman scattering microscopy, Journal of Biomedical Optics, 2011, Vol.16, No.2, pages 021111-1 - 021111-5, ISSN 1083-3668, E-ISSN 1560-2281	1-27