

(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
2019年5月9日(09.05.2019)



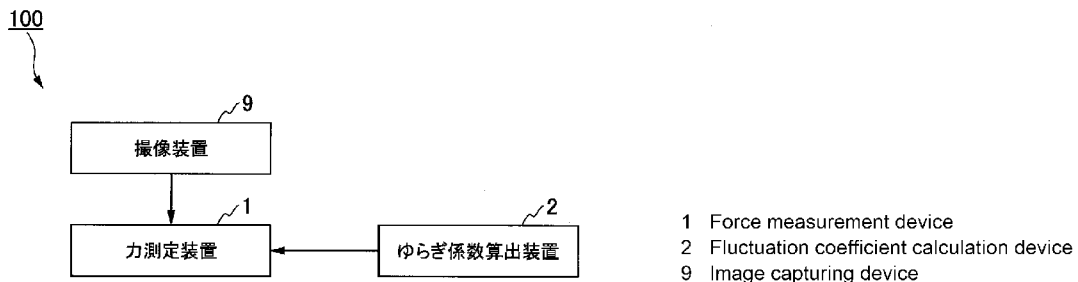
(10) 国際公開番号

WO 2019/088089 A1

- (51) 国際特許分類:
G01L 1/00 (2006.01) *G01L 5/00* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 21/85* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/040300
- (22) 国際出願日: 2018年10月30日(30.10.2018)
- (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 2017-210698 2017年10月31日(31.10.2017) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP). 国立研究開発法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 林 久美子 (HAYASHI Kumiko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 岡田 康志 (OKADA Yasushi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) **Title:** FORCE MEASUREMENT METHOD, FORCE MEASUREMENT DEVICE, FORCE MEASUREMENT SYSTEM, FORCE MEASUREMENT PROGRAM, AND RECORDING MEDIUM

(54) 発明の名称: 力測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体



(57) **Abstract:** One aspect of the present invention is a force measurement method comprising: a first acquisition step for acquiring first data indicating time-varying change in position of a cargo during a period wherein cargo displacement over unit time is substantially constant, from among the data included in time course data indicating the trajectory of cargo movement acquired by a non-invasive means; a fluctuation value calculation step for calculating, on the basis of a first probability distribution, a fluctuation value proportional to a force applied to the cargo by a motor protein transporting the cargo, the first probability distribution being a probability distribution based on the first data and indicating the distribution of the probability that the change in a prescribed position of the cargo over unit time is a prescribed amount; and a force calculation step for calculating the force on the basis of the calculated fluctuation value.

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), 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))

(57) 要約: 本発明の一態様は、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得ステップと、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出ステップと、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出ステップと、を有する力測定方法である。

明 細 書

発明の名称：

力測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体

技術分野

[0001] 本発明は、力測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体に関する。

本願は、2017年10月31日に、日本に出願された特願2017-210698号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 多くの真核細胞は発達した細胞内輸送システムを備えている。従来、神経細胞が細胞内輸送システムの研究対象として用いられてきた。神経細胞は、細胞体と細胞体から延びる長い突起（軸索）とを有する。神経細胞の形態は細胞骨格を構成するタンパク質群によって形成されており、軸索は主に微小管を構成するチューブリンによって形成されている。微小管は、細胞体と軸索の先端にあるシナプスとの間の物流システム（軸索輸送）の幹線として機能する。軸索輸送で運ばれるカーゴ（Cargo）の例として、脂質二重膜によって覆われた細胞内小器官（オルガネラ）や小胞（ベシクル）が知られている。細胞小器官の例としては、例えば、ミトコンドリアやエンドソームが知られている。小胞内には、軸索やシナプスの形成材料又は情報伝達物質としてのタンパク質、核酸高分子、低分子等が含まれている。カーゴの輸送には、細胞体から軸索先端側へ向かう順行性輸送と、その逆方向の逆行性輸送とがある。順行性輸送では、キネシンと呼ばれるモータータンパク質が、カーゴを背負って微小管の上を辿りながら移動することが知られている。同様に、逆行性輸送ではダイニンと呼ばれるモータータンパク質が、カーゴの輸送を担っている。モータータンパク質は、ATPの加水分解によって得たエネルギーを用いてカーゴを輸送する。

軸索輸送の乱れは、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経性疾患の一因とも考えられており、軸索輸送の解析が神経性疾患の理解や治療に貢献すると期待されている。

ここまで、軸索輸送を具体例としてモーター蛋白質によるカーゴの輸送を説明したが、モータータンパク質によるカーゴの輸送は、軸索輸送に限られない。神経細胞においても、軸索のみならず、樹状突起などの突起内あるいは細胞体におけるカーゴの輸送が行われる。その際、カーゴは必ずしも脂質二重膜に覆われているとは限らず、タンパク質複合体あるいはタンパク質・核酸複合体などの場合がある。また、モータータンパク質は、必ずしも微小管の上を辿って移動するキネシンあるいはダイニンだけが用いられるわけではなく、アクチン繊維上を移動するミオシンなど様々なモーター分子が用いられる場合がある。また、細胞内輸送は、神経細胞に限らず、全ての真核細胞で同様の機構により行われている。例えば皮膚のメラニン細胞(メラノサイト)では、メラニン色素を含む細胞内顆粒がカーゴとして輸送され、膵臓のインスリン分泌細胞では、インスリンを含む細胞内小胞がカーゴとして輸送される。すなわち、ここまで、神経細胞を具体例としてモータータンパク質によるカーゴの輸送を説明したが、モータータンパク質によるカーゴの輸送は、必ずしも神経細胞だけで行われるわけではなく、神経細胞以外の細胞であっても行われる。例えば、神経細胞以外の細胞では、モータータンパク質によるカーゴの輸送は、軸索の他、微小管の上をモータータンパク質が移動することで行われる。

[0003] 従来、このようなカーゴの輸送を解析するため、生きている細胞内のカーゴにかかる力を測定することが行われていた。生きている細胞内のカーゴにかかる力を測定する方法としては、例えば、光ピンセットを用いた方法があった。光ピンセットを用いた方法は、光ピンセットによって観察対象のカーゴに力をくわえて、カーゴを引っ張ることでカーゴにかかる力を測定する方法であった。なお、カーゴにかかる力とは、例えば、モータータンパク質がカーゴにかける力である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2009-77635号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：K. Hayashi, C.G. Pack, M.K. Sato, K. Mouri, K. Kaizu, K. Takahashi, and Y. Okada, "Viscosity and drag force involved in organelle transport: Investigation of the fluctuation dissipation theorem", The European Physical Journal E, 36: 136 (2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、光ピンセットを用いた方法は、カーゴとその周囲の細胞質の屈折率差及びカーゴの大きさとレーザー光の強度が発生力を決めるため、油滴のような特定のカーゴ以外への適用が難しい。その結果、光ピンセットを用いた方法を油滴等以外のカーゴに適用しようとすると過大な強度のレーザー光が必要であり、細胞侵害・熱的ダメージを生じる場合があった。

このように、光ピンセットを用いた方法は、レーザー光を用いる侵襲的な方法であるため観察対象の細胞を傷つける可能性があるという問題があった。

[0007] 上記事情に鑑み、本発明は、生きている細胞内のカーゴにかかる力を非侵襲的な方法で測定する技術を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の一態様は、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得ステップと、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモーター

タンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出ステップと、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出ステップと、を有する力測定方法である。

[0009] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、前記力算出ステップは、前記ゆらぎ値に対してクラスタリングを行うことで前記力を算出する。

[0010] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータのうち、前記第一のデータと、前記カーゴの位置が時間によらず略同一の位置である期間の前記カーゴの位置の時間変化を示す第二のデータとを含むタイムコースデータを取得する第二取得ステップと、

前記力と前記ゆらぎ値との換算係数であるゆらぎ係数を前記第一及び第二のデータに基づいて算出するゆらぎ係数算出ステップとを有する。

[0011] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記第二のデータに基づいて、前記カーゴを囲む媒質の粘性係数を算出する。

[0012] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記第二取得ステップにおいて取得された前記第一のデータに基づいて、前記カーゴが移動する速さを算出する。

[0013] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記粘性係数と前記速さとに基づいて前記ゆらぎ係数を算出する。

[0014] 本発明の一態様は、上記の力測定方法であって、前記ゆらぎ値算出ステップは、前記位置の変化量を ΔX とし、前記単位時間における ΔX の値が ΔX_1 である確率を第一の確率 $P_1(\Delta X_1)$ とし、前記ゆらぎ値を χ とした場合に、 $\chi = \ln [P_1(\Delta X_1) / P_1(-\Delta X_1)] / \Delta X_1$ の式によって χ を算出する。

[0015] 本発明の一態様は、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータ

を取得する第一取得部と、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出部と、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出部と、を備える力測定装置である。

[0016] 本発明の一態様は、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得部と、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出部と、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出部と、を備える力測定システムである。

[0017] 本発明の一態様は、コンピュータに、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得させ、前記コンピュータに、前記タイムコースデータに基づく確率分布であって、単位時間中における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出させ、前記コンピュータに、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出させるための力測定プログラムである。

[0018] 本発明の一態様は、コンピュータに、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得させ、前記コンピュータに、前記タイムコースデー

タに基づく確率分布であって、単位時間中における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出させ、前記コンピュータに、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出させるためのプログラムを記憶する記録媒体である。

発明の効果

[0019] 本発明により、生きている細胞内のカーゴにかかる力を非侵襲的な方法で測定することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1A]ゆらぎの定理が力 F_c を反映することを説明する説明図。

[図1B]ゆらぎの定理が力 F_c を反映することを説明する説明図。

[図2]実施形態の力測定装置1を用いて構成された力測定システム100の具体例を示す図。

[図3]実施形態の観察データの具体例を示す図。

[図4]実施形態の複数の観察データが観察対象の移動を示すことを説明する説明図。

[図5]実施形態の力測定装置1の機能構成の具体例を示す図。

[図6]実施形態のタイムコースデータ、定速移動データ及び定速期間の具体例を示す図。

[図7]実施形態の第一確率分布算出処理における変位量算出処理の具体的な手順を説明する説明図。

[図8]実施形態の第一確率分布の具体例な算出結果を示す図。

[図9]実施形態のゆらぎ値 χ の具体的な算出結果を示す図。

[図10]実施形態のクラスタリング部14によってクラスタリングされたゆらぎ値 χ を示す図。

[図11]実施形態のゆらぎ係数算出装置2の機能構成の具体例を示す図。

[図12]実施形態の静止データ及び定速移動データを含むタイムコースデータの具体例を示す図。

[図13]実施形態の力測定装置 1 がモータータンパク質にかかる力を算出する具体的な処理の流れを示すフローチャート。

[図14]実施形態の単位時間繰り返し制御（ステップ S 1 0 3）の具体的な処理の流れを示すフローチャート。

[図15A]Ciliobrevinの細胞への添加によってゆらぎ値 χ の度数分布が変化することが、実施形態の力測定装置 1 を用いた χ の測定によって明らかになったことを示す具体的な結果を示す図。

[図15B]Ciliobrevinの細胞への添加によってゆらぎ値 χ の度数分布が変化することが、実施形態の力測定装置 1 を用いた χ の測定によって明らかになったことを示す具体的な結果を示す図。

[図15C]Ciliobrevinの細胞への添加によってゆらぎ値 χ の度数分布が変化することが、実施形態の力測定装置 1 を用いた χ の測定によって明らかになったことを示す具体的な結果を示す図。

[図16A]エンドソームが細胞中心と細胞膜との間をキネシンによって輸送されることを説明する説明図。

[図16B]エンドソームが細胞中心と細胞膜との間をダイニンによって輸送されることを説明する説明図。

[図17A]エンドソームがキネシンによって輸送される場合とダイニンによって輸送される場合とのゆらぎ値 χ の度数分布の違いが実施形態の力測定装置 1 を用いた測定で明らかになったことを示す図。

[図17B]エンドソームがキネシンによって輸送される場合とダイニンによって輸送される場合とのゆらぎ値 χ の度数分布の違いが実施形態の力測定装置 1 を用いた測定で明らかになったことを示す図。

発明を実施するための形態

[0021]（原理）

本発明は、カーゴにかかる力に対してゆらぎの定理によって関係づけられた物理量を測定することでカーゴにかかる力を測定する。そこで、本発明の説明にあたって、まずはゆらぎの定理を説明した後、本発明によってカーゴ

にかかる力が測定される原理を説明する。

[0022] ゆらぎの定理はD. J. Evansらによって1993年に発表された、物理学の1分野である非平衡統計力学の定理である。ゆらぎの定理は、熱力学的に非平衡な状態にある系における所定の物理量と、その所定の物理量を変化させる物理量とを関係づける定理である。熱力学的に非平衡な状態にある系とは、例えば、カーゴが移動する系であり、その場合、ゆらぎの定理は、その系におけるカーゴの位置と、カーゴにかかる力とを関係づける。その場合、移動するカーゴの位置とその移動するカーゴにかかる力とを関係づけるゆらぎの定理は、次の式で表わされることが知られている。

[0023] [数1]

$$\frac{\ln \left[\frac{P(\Delta X)}{P(-\Delta X)} \right]}{\Delta X} = AF \quad \cdot \cdot \cdot (1)$$

[0024] ΔX は、単位時間中のカーゴの変位量を表し、 $P(\Delta X)$ は、カーゴの変位量が ΔX である確率を表す。なお、 ΔX は、以下の式(2)で示される。

[0025] [数2]

$$\Delta X = X(t + \Delta t) - X(t) \quad \cdot \cdot \cdot (2)$$

[0026] 式(2)において、 $X(t)$ は、時刻 t におけるカーゴの位置である。式(2)において、 $X(t + \Delta t)$ は、時刻 $t + \Delta t$ におけるカーゴの位置である。

ΔX は、力 F 。(式(1)では F と表記)は、カーゴにかかる力の大きさを表す。 A は、式(1)の左辺が表す物理量と力 F との換算係数である。以下、式(1)の左辺が表す物理量をゆらぎ値 χ といい、 A をゆらぎ係数という。ゆらぎ係数 A は、カーゴとモータータンパク質との組み合わせに固有の値である。

[0027] カーゴの変位量が測定されれば、ゆらぎ値 χ が算出される。そのため、ゆ

らぎ係数 A が与えられれば、式 (1) によりカーゴにかかる力 F_c が算出され得る。

なお、カーゴの変位量は、カーゴの位置の変化量を表す。また、カーゴの位置とは、カーゴの部位の位置であればどのような位置であってもよく、例えば、カーゴの重心位置である。

[0028] 図 1 A 及び図 1 B は、ゆらぎの定理が力 F_c を反映することを説明する説明図である。図 1 A 及び図 1 B は、どちらもカーゴに力がかかる場合における ΔX の確率分布を表す。ただし、図 1 A は、カーゴにかかるノイズが大きい場合の ΔX の確率分布を表す。

図 1 A 及び図 1 B における確率分布は、例えば、どちらもガウス分布に従う確率分布である。図 1 A と図 1 B とを比較すると、図 1 A においては、カーゴにかかるノイズが小さいため、 ΔX がとり得る値の範囲が図 1 B における ΔX がとり得る値の範囲よりも狭い。

そのため、図 1 A における確率分布のピークの高さは、図 1 B における確率分布のピークの高さよりも低い。しかしながら $P(\Delta X)$ と $P(-\Delta X)$ の比はどちらも等しく、 $P(\Delta X)$ そのものでなく $P(\Delta X)$ と $P(-\Delta X)$ の比が力 F_c を反映していることを表す。そのため、ゆらぎの定理は力 F_c を反映する定理であると言える。

[0029] カーゴの変位が測定された場合には、式 (1) の左辺の値だけでなくゆらぎ係数 A も算出され得る。このことを以下で説明する。粘性のある媒質中を速さ V で定速移動するカーゴにおいては、モータータンパク質によってカーゴにくわえられる力と、媒質による粘性抵抗の力とが釣り合う。そのため、媒質の粘性係数 Γ がわかれば、モータータンパク質によってカーゴにくわえられる力 F_c が算出され得る。具体的には、力 F_c と粘性係数 Γ とは以下の式 (3) の関係を満たす。

[0030] [数3]

$$F_c = \Gamma V \quad \cdot \cdot \cdot \quad (3)$$

[0031] そのため、ゆらぎ値 χ と、粘性係数 Γ に基づいて算出された力 F_0 に基づいて、ゆらぎ係数 A が算出される。なお、ゆらぎ係数 A は、ボルツマン定数 k_B と、非平衡状態における観察対象のカーゴを含む系の温度 T_{eff} (すなわち、一般に非平衡温度又は有効温度といわれる温度) との積である。非平衡状態は、カーゴが輸送されている状態である。

モータータンパク質によるカーゴの輸送においては、 T_{eff} は一定値である。このことは実験的に検証済みである。

[0032] (実施形態)

図2は、実施形態の力測定装置1を用いて構成された力測定システム100の具体例を示す図である。力測定システム100は、非侵襲的な手段によって細胞中のカーゴを検出し、そのカーゴの動きを記録することで、そのカーゴにかかる力を測定するシステムである。力測定システム100は、力測定装置1、ゆらぎ係数算出装置2及び撮像装置9を備える。

[0033] なお、本発明が観察対象とする細胞は、カーゴ及びモータータンパク質を有し、細胞内でモータータンパク質がカーゴを輸送する細胞であれば、どのような細胞であってもよい。一般的に知られる真核細胞の多くはこのようなカーゴ及びモータータンパク質を有する。細胞内におけるカーゴの輸送を観察し易いことから、観察対象は神経細胞であることが好ましい。神経細胞以外で観察対象として好適な細胞としては、例えばグリア細胞、血管内皮細胞、皮膚などの繊維芽細胞、メラニン細胞、一般的に用いられる株化された動物細胞、卵細胞等が挙げられる。

[0034] 本発明が観察対象とする神経細胞の種類は特に限定されず、例えば、神経細胞内の動画撮影が容易である観点からin vitroで培養可能な神経細胞が好ましい。また、神経細胞を補助する細胞あるいはその他の細胞を併存させた細胞であってもよい。このような細胞として、例えば、アストロサイト(星状膠細胞)、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞などのグリア細胞、血管上皮細胞などの血管系細胞など、繊維芽細胞などの間葉系細胞などが挙げられる。また、このような神経細胞の例として、アミノ酸系神経伝達物質を分泌す

る神経細胞、ペプチド系神経伝達物質を分泌する神経細胞、モノアミン類やアセチルコリンを分泌する神経細胞等が挙げられる。神経細胞を培養する際には、生体内環境に近づける目的で、神経細胞を補助する細胞を併存させてもよい。このような補助細胞として、例えば、アストロサイト(星状膠細胞)、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞等のグリア細胞等が挙げられる。

[0035] また、本発明が観察対象とする細胞内で輸送されるカーゴの種類は特に限定されず、光学機器によってゆらぎを測定可能なカーゴであればよい。ゆらぎを測定する際のカーゴの蛍光標識の有無は限定されない。カーゴが脂質二重膜で包まれた小胞又は細胞小器官である場合、例えば、D_iD、D_iI、D_iO、D_iR等のカルボシアニン色素によって蛍光標識することができる。あるいは、カーゴに含まれるタンパク質をGFPなどの蛍光タンパク質によって蛍光標識することができる。その他、蛍光色素を用いた染色、ビオチン・アビジン、抗体などを用いた公知の標識方法も適用可能である。観察するカーゴの輸送経路は特に限定されず、軸索輸送でもよいし、その他の細胞内輸送であってもよく、解析の目的に応じて適宜選択することができる。

[0036] 力測定装置1は、観察対象のカーゴの動きを示す画像のデータ群に基づいて、観察対象のカーゴにかかる力 F_c を算出する。以下、観察対象のカーゴの動きを示す画像のデータ群を、観察データという。観察対象のカーゴの動きを示す画像は、例えば、二次元画像であってもよい。また、観察データは、例えば動画であってもよい。

[0037] ゆらぎ係数算出装置2は、観察データに基づいて、観察対象のカーゴのゆらぎ係数 A を算出する。ゆらぎ係数算出装置2は、算出したゆらぎ係数 A を力測定装置1に出力する。

[0038] 撮像装置9は、非侵襲的な手段によって、観察対象のカーゴを撮影し、そのカーゴの動きを記録した観察データを生成する。非侵襲的な手段とは、例えば、可視光で観察対象に関する情報を取得する手段であってもよい。観察対象に関する情報とは、例えば、観察対象の重心位置を示す信号である。また、非侵襲的な手段とは、例えば、観察対象を蛍光標識しその蛍光によって

観察対象に関する情報を取得する手段であってもよい。これらの非侵襲的な手段は、蛍光顕微鏡や、微分干渉顕微鏡等の顕微鏡を用いて実現されてもよい。

また、非侵襲的な手段とは、観察対象への影響が少ない強度の磁場によって観察対象に関する情報を取得する手段であってもよい。なお、侵襲的な手段とは、例えば、光ピンセットのような、観察対象へレーザーを照射することで観察対象に関する情報を取得する手段である。

[0039] なお、カーゴの動きを記録した観察データを生成する方法は特に限定されず、例えば、市販の細胞動態観察用デジタルビデオカメラを備えた共焦点レーザー顕微鏡などを用いる公知方法が挙げられる。撮影のフレームレートとしては、カーゴの軸索輸送の速度等の観点から、10～100フレーム／秒程度またはそれ以上が好ましく、100フレーム／秒が特に好ましい。

また、撮影した画像フレーム中の軸索領域を抽出する工程又は手段では、種々の方法を適用することが可能であるが、例えば、目視によって軸索領域を判断する方法が行われる。

[0040] 図3は、実施形態の観察データの具体例を示す図である。

図3は、ある時刻 t における二次元の静止画像である。図3の静止画像における点線で囲まれた領域は軸索を表す。図3において、線で囲まれた領域101内の発光する点は、観察対象のカーゴである。

[0041] 図4は、実施形態の複数の観察データが観察対象の移動を示すことを説明する説明図である。

図4において、画像102は、時刻 $t = 0$ sにおける観察対象のカーゴの位置を示す。

なお、ここで観察対象のカーゴは、図3における領域101内の観察対象のカーゴである。図4において、画像103は、0 sより後であって1.8 sより前の時刻における観察対象のカーゴの位置を示す。図4において、画像104は、時刻 $t = 1.8$ sにおける観察対象のカーゴの位置を示す。

[0042] 観察データは、図3に示される二次元の静止画像を、時刻を変えて複数備

えたデータ群である。そのため、観察データは、自身が備える異なる時刻における静止画像のデータによって、図4に示すような観察対象のカーゴの移動を示す。

[0043] 図5は、実施形態の力測定装置1の機能構成の具体例を示す図である。力測定装置1は、第一軌跡データ取得部11、ゆらぎ値算出部12、繰り返し制御部13、クラスタリング部14、ゆらぎ係数記憶部15及び力算出部16を備える。

[0044] 第一軌跡データ取得部11は、観察データに基づいて生成された定速移動データを含むタイムコースデータを取得する。タイムコースデータは、観察データが示す観察対象の軌跡の所定の一軸上の射影を示すデータであって、時刻 t と時刻 t におけるカーゴの位置 X との二つの値を有するデータの集合である。所定の一軸とは、どのような軸であってもよく、例えば、カーゴが輸送される方向に平行な軸であってもよい。また、定速移動データは、タイムコースデータに含まれるデータであって、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間（以下「定速期間」という。）におけるカーゴの位置の時間変化を示すデータである。すなわち、定速移動データは、カーゴが概ね一定の速度で移動する期間のカーゴの位置の時間変化を示すデータである。定速移動データもまた、時刻 t とカーゴの位置 X との二つの値を有するデータの集合である。

[0045] 図6は、実施形態のタイムコースデータ、定速移動データ及び定速期間の具体例を示す図である。

図6のグラフは、時刻 $t = 0$ sから $t = 10$ sまでの時間におけるカーゴの位置 X を示すタイムコースデータである。図6において、横軸は時刻を表し、縦軸はカーゴの位置 X を表す。図6において縦軸の X は、位置 X が時刻 t に依存することを明記するために $X(t)$ と表されている。図6において、時刻0から時刻 t_{s1} までの期間のデータは、観察対象のカーゴが概ね一定の速度で移動することを示すデータであり、定速移動データの具体例である。また、時刻0から時刻 t_{s1} までの期間は、定速期間の具体例である。図6

には、定速移動データを示すグラフの一部分の拡大図も示されている。拡大図の直線は、定速移動データに対する回帰直線である。回帰直線は、 X の値が大きくなる方向に一定の速さでカーゴが移動することを示す。拡大図は、 50 ms 以下の短時間ではカーゴの移動の速さは一定ではなく、 50 ms で 200 nm 以下の位置のゆらぎを有する速さで移動することを示す。

[0046] 図5の説明に戻る。ゆらぎ値算出部12は、定速移動データに基づいてゆらぎ値 χ を算出する。具体的にはゆらぎ値算出部12は、第一確率分布算出処理を実行した後にゆらぎ値算出処理を実行することで、ゆらぎ値を算出する。以下、第一確率分布算出処理とゆらぎ値算出処理の具体的な処理内容を説明する。まず、第一確率分布算出処理を説明する。

[0047] 第一確率分布算出処理は、ひとつの定速移動データに基づいて定速期間中の単位時間 Δt におけるカーゴの位置の変位量 ΔX の確率分布を算出する処理である。具体的には、第一確率分布算出処理は、まず、定速移動データにおける時間原点を t_0 とし、時間原点 t_0 におけるカーゴの位置を X_0 とし、時刻 $t_0 + n \times \Delta t$ (n は整数)におけるカーゴの位置を X_n とした場合の、カーゴの位置の変位量 $\Delta X_n = X_n - X_{(n-1)}$ をさまざまな n に対して取得する。以下、カーゴの位置の変位量 ΔX_n をさまざまな n に対して取得する処理を変位量算出処理という。次に第一確率分布算出処理は、カーゴの位置の変位量 ΔX の値が ΔX_n である確率分布（以下「第一確率分布」という。）を算出する。

[0048] 図7は、実施形態の第一確率分布算出処理における変位量算出処理の具体的な手順を説明する説明図である。

図7のグラフは、図6におけるタイムコースデータの一部分の拡大図におけるグラフである。図7において、ゆらぎ値算出部12は、まず、変位量算出処理を実行することで、所定の単位時間 Δt ごとに時刻 t_0 から時刻 t_m までのカーゴの位置（すなわち、 X_0 、 X_1 、 X_2 、 $\dots$ 、 X_m ）を取得する。次に、ゆらぎ値算出部12は、変位量算出処理を実行することで、カーゴの位置の変位量を算出する。すなわち、 $\Delta X_1 = X_1 - X_0$ 、 $\Delta X_2 = X_2 - X_1$ 、 ΔX

$_3 = X_3 - X_2$ 、 $\cdots \Delta X_m = X_m - X_{m-1}$ を算出する。このようにして、ゆらぎ値算出部 12 は、所定の単位時間 Δt ごとに時刻 t_0 から時刻 t_m までのカーゴの位置を取得する。

[0049] 図 5 の説明に戻る。ゆらぎ値算出部 12 が実行するゆらぎ値算出処理を説明する。ゆらぎ値算出部 12 は、ゆらぎ値算出処理によって、第一確率分布と式 (1) とに基づいてゆらぎ値 χ を算出する。ゆらぎ値 χ は上述したように、式 (1) の左辺が表す物理量である。ゆらぎ値算出処理において、式 (1) の左辺における $P(\Delta X)$ に代入される値は、第一確率分布が表す確率の値であって、カーゴの位置の変位量が ΔX である確率の値である。

[0050] 繰り返し制御部 13 は、複数のゆらぎ値 χ を算出するようにゆらぎ値算出部 12 を制御する。具体的には、繰り返し制御部 13 は、まず、ひとつの定速移動データ対して、最短単位時間から最長単位時間までの所定の複数の単位時間 Δt におけるゆらぎ値 χ を算出するようにゆらぎ値算出部 12 を制御する。以下、この制御を単位時間変更繰り返し制御という。最長単位時間は、ユーザによって予め定められた所定の時間であって、単位時間 Δt がとり得る時間のうち、最短の時間である。最長単位時間は、ユーザによって予め定められた所定の時間であって、単位時間 Δt がとり得る時間のうち、最長の時間である。最短単位時間は例えば、10ms であってもよい。最長単位時間は例えば、100ms であってもよい。また、単位時間は例えば、50ms であってもよい。さらに、繰り返し制御部 13 は、単位時間変更繰り返し制御を、第一軌跡データ取得部 11 が取得した定速移動データを含むタイムコースデータのそれぞれに対して行う。

なお、単位時間変更繰り返し制御は、例えば、最短単位時間から最長単位時間まで、時間の短い方の単位時間 Δt から順番に各 Δt における、ゆらぎ値 χ を算出するようにゆらぎ値算出部 12 を制御する制御であってもよい。

[0051] 図 8 及び図 9 によって、ゆらぎ値算出部 12 及び繰り返し制御部 13 によって算出された第一確率分布及びゆらぎ値 χ の具体例を示す。

[0052] 図 8 は、実施形態の第一確率分布の具体的な算出結果を示す図である。図

8は、単位時間 Δt を10ms、50ms及び100msとした場合の第一確率分布を表す。第一確率分布は、単位時間 Δt が長くなるほど、分布のピークにおける ΔX の値が大きくなる方向にピークが移動する。この結果は、カーゴが一定の速さで動いているために生じた結果であり、時間が長くなればカーゴが移動する距離が長くなるために生じた結果である。また、第一確率分布は、単位時間 Δt が長くなるほど分散が大きくなる。この結果は、時間が長くなるほどカーゴが移動する距離が長くなり、単位時間におけるカーゴの変位量のばらつきが大きくなるために生じた結果である。

[0053] 図9は、実施形態のゆらぎ値 χ の具体的な算出結果を示す図である。より具体的には、図9は、ひとつのタイムコースデータに対する複数の単位時間 Δt ごとの χ の値を示すグラフである。図9は、単位時間 Δt が大きくなるにつれてゆらぎ値 χ が一定値に収束することを示す。 Δt が大きくなるにつれてゆらぎ値 χ が一定の値に収束する結果は、系が緩和することが反映された結果である。系が緩和するとは、観察対象のカーゴを含む系が平衡状態に緩和することを意味する。緩和は、系に含まれる物質のミクロな運動や、その系内のモータータンパク質のATP加水分解等によって引き起こされる。

[0054] 図5の説明に戻る。クラスタリング部14は、ゆらぎ値算出部12が算出した複数のゆらぎ値 χ を対象としてクラスタリングを実行し、測定に関するばらつきを減らした χ の値を出力する。なお、測定に関するばらつきとは、例えば、測定時の観察対象を含む系の温度や湿度等の変化や測定装置の振動等によって引き起こされる取得データのばらつきである。具体的には、クラスタリング部14はまず、繰り返し制御部13の制御によってゆらぎ値算出部12が算出した複数のゆらぎ値 χ に対してクラスタリングを実行しゆらぎ値 χ を分類する。クラスタリングは、クラスタ数を自動推定するための基準値を有するクラスタリング方法であればどのような方法で行われてもよい。例えば、基準値であるAIC (Akaike's Information Criterion)の算出を伴ったk-means methodであってもよい。クラスタ数を自動推定するための基準値はAICに限らず、例えばBIC (Bayesian Information Criterion) や

、MDL (Minimum Description Length)等の基準値であってもよい。クラスタリングする方法はk-means methodに限らず、例えば、k-means++ methodであってもよい。

次にクラスタリング部14は、クラスタリングした結果の代表値を、測定に関するばらつきを減らした χ として出力する。なお、代表値はクラスタリングの方法ごとにクラスタを代表する値であればどのような値であってもよく、例えば、平均値であってもよいし、中央値であってもよい。

[0055] 図10は、実施形態のクラスタリング部14によってクラスタリングされたゆらぎ値 χ を示す図である。図10は、代表値が離散化された3つのクラスタ（すなわち、第1～3のクラスタ）を表す。第1のクラスタに属するゆらぎ値 χ の大きさは、 $\Delta t = 100 \text{ ms}$ において、0以上0.2以下の値である。第2のクラスタに属するゆらぎ値 χ の大きさは、 $\Delta t = 100 \text{ ms}$ において、0.1以上0.2以下の値である。第3のクラスタに属するゆらぎ値 χ の大きさは、 $\Delta t = 100 \text{ ms}$ において、0.3以上0.6以下の値である。なお、図10における代表値は平均値である。第1～3のクラスタの代表値の値は、小さな順に、第1のクラスタの代表値、第2のクラスタの代表値、第3のクラスタの代表値である。また、第2のクラスタの代表値及び第3のクラスタの代表値は、それぞれ第1のクラスタの代表値の整数倍である。

[0056] ゆらぎ係数記憶部15は、ゆらぎ係数算出装置2が算出したゆらぎ係数Aを記憶する。

ゆらぎ係数記憶部15は、磁気ハードディスク装置や半導体記憶装置などの記憶装置を用いて構成される。

[0057] 力算出部16は、ゆらぎ値 χ とゆらぎ係数Aとに基づいて、観察対象のカーゴにかかる力 F_c を算出する。具体的には、式(1)と式(1)の右辺が χ であることを用いて、 F_c を算出する。

[0058] 図11は、実施形態のゆらぎ係数算出装置2の機能構成の具体例を示す図である。ゆらぎ係数算出装置2は、第二軌跡データ取得部21、粘性係数算

出部 2 2 及びゆらぎ係数算出部 2 3 を備える。

[0059] 第二軌跡データ取得部 2 1 は、観察データに基づいて生成された定速移動データ及び静止データを含むタイムコースデータを取得する。静止データは、タイムコースに含まれるデータであって、カーゴの位置が時間によらず略同一の位置である期間（以下「静止期間」という。）のカーゴの位置の時間変化を示すデータである。すなわち、静止データは、カーゴが時刻によらず同じ位置にとどまっている期間のカーゴの位置の時間変化を示すデータである。静止データもまたタイムコースデータと同様に、時刻 t とカーゴの位置 X との二つの値を有するデータの集合である。なお、定速移動データを含むタイムコースデータのうち、定速移動データだけではなく、さらに静止データをも含むタイムコースデータの割合は、1 割程度である。

[0060] 図 1 2 は、実施形態の静止データ及び定速移動データを含むタイムコースデータの具体例を示す図である。

図 1 2 のグラフは、図 6 のグラフと同様のグラフであり、時刻 $t = 0 \text{ s}$ から $t = 10 \text{ s}$ までの期間におけるカーゴの位置 X を示すタイムコースデータを示すグラフである。図 1 2 において、横軸は時刻を表し、縦軸はカーゴの位置 X を表す。図 1 2 においても、図 6 と同様に縦軸の X は、位置 X が時刻 t に依存することを明記するために $X(t)$ と表されている。図 1 2 において、時刻 t_{s1} から時刻 t_{s2} までの期間のデータは、観察対象のカーゴが時刻によらず同じ位置にとどまっていることを示すデータである。すなわち、図 1 2 における時刻 t_{s1} から時刻 t_{s2} までの期間のデータは、静止データの具体例である。また、時刻 t_{s1} から時刻 t_{s2} までの期間は、静止期間の具体例である。なお、時刻 0 から時刻 t_{s1} までの期間のデータは、図 5 と同様の定速移動データの具体例である。

[0061] 図 1 1 の説明に戻る。粘性係数算出部 2 2 は、静止データに基づいて、粘性係数を算出する。具体的には、粘性係数算出部 2 2 は、第二確率分布算出処理、分布係数算出処理、パワースペクトル算出処理、パワー係数算出処理及び粘性係数算出処理を順次実行することで、粘性係数を算出する。

[0062] 第二確率分布算出処理は、ひとつの静止データに基づいて静止期間中の時刻 t におけるカーゴの位置 X の確率分布（以下「第二確率分布」という。）を算出する処理である。第二確率分布は、ボルツマン分布にしたがう分布である。

[0063] 分布係数算出処理は、第二確率分布算出処理によって算出された第二確率分布に対して、フィッティングパラメータとして K を含む関数であるボルツマン関数 $P_B(X)$ によるフィッティングを行い、フィッティングパラメータ K の値を算出する。ボルツマン関数 $P_B(X)$ の具体的な関数形は、式（４）で表される関数形である。以下、フィッティングパラメータ K を分布係数という。なお、フィッティングは、どのようなフィッティング方法で行われてもよく、例えば、最小二乗法によって行われてもよい。

[0064] [数4]

$$P_B(X) = \frac{\exp\left(\frac{-Kk_bTX^2}{2}\right)}{Z} \quad \cdot \cdot \cdot \quad (4)$$

[0065] $P_B(X)$ は、カーゴの位置が X である確率を表す。 Z 及び T はそれぞれ、分配関数及び環境の温度を表す。環境の温度とは、観察対象のカーゴを取り囲む媒質の温度である。

[0066] パワースペクトル算出処理は、第二確率分布を周波数 ν によってフーリエ変換し、パワースペクトルを算出する処理である。

[0067] パワー係数算出処理は、フィッティングパラメータとして A_p 及び B_p を含むローレンチアン型の関数 $g(\nu)$ によってパワースペクトルをフィッティングし、フィッティングパラメータ B_p を算出処理である。関数 $g(\nu)$ の具体的な関数形は式（５）で表される関数形である。以下、フィッティングパラメータ B_p をパワー係数という。フィッティングは、どのようなフィッティング方法で行われてもよく、例えば、最小二乗法によって行われてもよい。

[0068]

[数5]

$$g(v) = \frac{A_p}{(1 + (B_p v)^2)} \quad \cdot \cdot \cdot \quad (5)$$

[0069] 粘性係数算出処理は、分布係数 K とパワー係数 B_p とを用いて、以下の式（6）によって表される粘性係数 Γ を算出する処理である。

[0070] [数6]

$$\Gamma = KB_p \quad \cdot \cdot \cdot \quad (6)$$

[0071] ゆらぎ係数算出部23は、粘性係数 Γ とゆらぎ値 χ とに基づいて、ゆらぎ係数 A を算出する。粘性係数算出部は、速さ算出処理及びゆらぎ係数算出処理を順次実行することで、ゆらぎ係数 A を算出する。

[0072] 速さ算出処理は、静止データを含むタイムコースデータの定速移動データを用いて、定速移動期間におけるカーゴの時間平均の速さ V を算出する処理である。具体的には、速さ算出処理は、横軸を時刻とし縦軸をカーゴの位置とするグラフにおける定速移動データの回帰直線の傾きを算出する処理である。

[0073] ゆらぎ係数算出処理は、速さ V 、粘性係数 Γ 及びゆらぎ値 χ によって、ゆらぎ係数 A を算出する処理である。ゆらぎ係数算出処理において、ゆらぎ係数算出部23はまず、式（3）によって算出される力 F_c とゆらぎ値算出部12によって算出されたゆらぎ値 χ との二つの値を有するデータ（以下「力ゆらぎ値対応データ」という。）を、静止データと定速移動データとを含む複数のタイムコースデータについて取得する。次に、ゆらぎ係数算出処理においてゆらぎ係数算出部23は、取得した複数の力ゆらぎ値対応データを、フィッティングパラメータ A_1 を含む以下の式（7）に示す一次関数によってフィッティングする。

[0074] [数7]

$$F_c = A_1 \chi \quad \cdot \cdot \cdot \quad (7)$$

[0075] A_1 はフィッティングパラメータであり、フィッティングによって得られた A_1 の値はゆらぎ係数 A である。フィッティングによって得られた A_1 の値がゆらぎ係数 A であることは式(1)及び式(6)によって明らかである。

[0076] 図13は、実施形態の力測定装置1がモータータンパク質にかかる力を算出する具体的な処理の流れを示すフローチャートである。

撮像装置9は、観察対象のカーゴの観察データを生成する(ステップS101)。第一軌跡データ取得部11は、撮像装置9が取得した観察データに基づいて生成された定速移動データを含むタイムコースデータを取得する(ステップS102)。繰り返し制御部13は、定速移動データを含むタイムコースデータのうちのひとつに対して(以下「算出対象データ」という。)、所定の複数の単位時間 Δt における単位時間繰り返し制御を実行することで、複数の単位時間 Δt におけるゆらぎ値 χ を算出する(ステップS103)。

繰り返し制御部13は、第一軌跡データ取得部11が取得した定速移動データを含むタイムコースデータのうち、第一確率分布算出処理が行われていないタイムコースデータがあるか否かを判定する(ステップS104)。第一確率分布算出処理が行われていないタイムコースデータがない場合(ステップS104:No)、クラスタリング部14は、ゆらぎ値 χ に対してクラスタリングを実行し、測定に関するばらつきを減らしたゆらぎ値 χ を算出する(ステップS105)。

[0077] クラスタリング部14が測定に関するばらつきを減らしたゆらぎ値 χ を算出した後、第二軌跡データ取得部21は、静止データ及び定速移動データを含むタイムコースデータを取得する(ステップS106)。第二軌跡データ取得部21が静止データ及び定速移動データを含むタイムコースデータを取得した後、粘性係数算出部22は、第二確率分布算出処理を実行することで、第二軌跡データ取得部21が取得した静止データに基づいて第二確率分布を算出する(ステップS107)。粘性係数算出部22は、第二確率分布を算出した後、第二確率分布に対して分布係数算出処理を実行し、式(4)で

表されるボルツマン関数 $P_B(X)$ における分布係数 K の値を算出する（ステップ $S108$ ）。分布係数 K を算出した、粘性係数算出部 22 は、第二確率分布に対してパワースペクトル算出処理を実行し、パワースペクトルを算出する（ステップ $S109$ ）。パワースペクトルを算出した粘性係数算出部 22 は、粘性係数算出処理を実行し粘性係数 Γ を算出する（ステップ $S110$ ）。

[0078] 粘性係数算出部 22 が粘性係数 Γ を算出した後、ゆらぎ係数算出部 23 は、ゆらぎ係数算出処理を実行し、ゆらぎ係数 A を算出する（ステップ $S111$ ）。ゆらぎ係数 A が算出された後、力算出部 16 は、ステップ $S105$ において算出された χ とステップ $S111$ において算出されたゆらぎ係数 A とに基づいて、カーゴにかかる力 F_c を算出する（ステップ $S112$ ）。

[0079] 一方、ステップ $S104$ において、第一確率分布算出処理が行われていないタイムコースデータがある場合（ステップ $S104$: Yes）、繰り返し制御部 13 は、そのタイムコースデータを新たな算出対象データとする（ステップ $S113$ ）。繰り返し制御部 13 は、新たな算出対象データに対して、単位時間繰り返し制御を実行する（ステップ $S103$ ）。

[0080] なお、ステップ $S106 \sim 110$ は必ずしも、ステップ 107 の後に実行される必要はなく、ステップ $S103 \sim 105$ と並列して実行されてもよいし、ステップ $S103 \sim 105$ よりも先に実行されてもよい。

[0081] 図 14 は、実施形態の単位時間繰り返し制御（ステップ $S103$ ）の具体的な処理の流れを示すフローチャートである。ゆらぎ値算出部 12 は、第一軌跡データ取得部 11 が取得したタイムコースデータを取得し、第一確率分布算出処理を実行する（ステップ $S201$ ）。ゆらぎ値算出部 12 は、第一確率分布算出処理を実行することで、第一確率分布を算出する。第一確率分布を算出したゆらぎ値算出部 12 は、ゆらぎ値算出処理を実行することによって、ゆらぎ値 χ を算出する（ステップ $S202$ ）。

[0082] このように構成された実施形態の力測定装置 1 によれば、カーゴの動きを示す二次元画像のデータ群に基づいて観察対象のカーゴにかかる力 F_c に比例

する値 χ を算出するゆらぎ値算出部 12 を備えるため、ユーザは生きている細胞内のカーゴにかかる力を非侵襲的な方法で測定することができる。

[0083] (神経細胞の培養方法 (例))

3 週齢 ICR マウス (オス) から上頸神経節を採取し、0.5%トリプシンと0.5%コラゲナーゼなどの酵素で処理した。個々に分かれた神経細胞を10%非働化牛血清入りDMEM/F12培地でリンスした後、マトリゲルコートされたガラスボトムディッシュに撒いた。この神経細胞を37℃、CO₂ 5%のインキュベータ内で10%非働化牛血清と200 ng/ml 2.5 S 神経成長因子入りDMEM/F12培地にて2~4日培養し、力測定装置 1 を用いた実験に用いた。

[0084] (細胞小器官 (例: エンドソーム) の染色方法)

培養中の神経細胞の培地に最終濃度100 nMとなるように蛍光色素 DiI を添加し、10分間染色した後、蛍光観察に用いた。

[0085] (蛍光観察の方法 (例))

染色後のディッシュをヒーティングプレート (CU-201, Live Cell Instrument) 上に設置し、37℃で保温しながら、メラニン細胞内の染色されたメラニン色素小胞を暗視野顕微鏡 (IX71, Olympus) で観察した。100倍の対物レンズ (UPlanFL 100x/1.3, Olympus) で98 frames per secondでEMCCDカメラ (LucaS (Andor)) を用いて動画を撮影した。動画からImageJ (Rasband, 1997) を用いて、メラニン色素小胞の重心位置のタイムコースデータを計算した。

[0086] 図 15 A、図 15 B 及び図 15 C は、モータータンパク質の機能を阻害する試薬であるCiliobrevinのメラニン細胞への添加によってゆらぎ値 χ の度数分布が変化することが、実施形態の力測定装置 1 を用いた χ の測定によって明らかになったことを示す具体的な結果を示す図である。

[0087] 図 15 A はCiliobrevinが細胞に添加されていない場合に力測定装置 1 によって測定されたゆらぎ値 χ の度数分布を示す図である。図 15 A において、 χ は、データの分布が4つのクラスタ (クラスタ 114~117) に分類される。

図 1 5 B は細胞培養培地中のCiliobrevin濃度が 2 0 μ Mである場合に力測定装置 1 によって測定されたゆらぎ値 χ の度数分布を示す図である。図 1 5 B において、 χ は、データの分布が 2 つのクラスタ（クラスタ 1 1 8 及び 1 1 9）に分類される。

図 1 5 C は細胞培養培地中のCiliobrevin濃度が 4 0 μ Mである場合に力測定装置 1 によって測定されたゆらぎ値 χ の度数分布を示す図である。図 1 5 C において、 χ は、データの分布が一つのクラスタ 1 2 0 に分類される。

[0088] 図 1 5 A と、図 1 5 B と、図 1 5 C との比較によって、Ciliobrevinの添加量が増加するとクラスタの数が減少することが示される。

[0089] 図 1 6 A 及び図 1 6 B は、エンドソームが細胞中心と細胞膜との間をキネシン又はダイニンによって輸送されることを説明する説明図である。

図 1 6 A は、エンドソーム 2 0 1 が自身に結合するキネシン 2 0 2 によって、細胞中心から細胞膜まで微小管にそって輸送されることを示す。

図 1 6 B は、エンドソーム 2 0 1 が自身に結合するダイニン 2 0 3 によって、細胞膜から細胞中心まで微小管にそって輸送されることを示す。

[0090] 図 1 7 A 及び図 1 7 B は、エンドソームがキネシンによって輸送される場合とダイニンによって輸送される場合とのゆらぎ値 χ の度数分布の違いが実施形態の力測定装置 1 を用いた測定で明らかになったことを示す図である。

[0091] 図 1 7 A は、図 1 6 A に示すキネシン 2 0 2 によってエンドソーム 2 0 1 が輸送された場合の χ の分布を示す図である。図 1 7 A において、ゆらぎ値 χ は、データの分布が 4 つのクラスタ（クラスタ 1 2 1 ~ 1 2 4）に分類される。クラスタ化はクラスタリング解析の結果である。

図 1 7 B は、図 1 6 B に示すダイニン 2 0 3 によってエンドソーム 2 0 1 が輸送された場合の χ の分布を示す図である。図 1 7 B において、ゆらぎ値 χ は、データの分布が 3 つのクラスタ（クラスタ 1 2 5 ~ 1 2 7）に分類される。

図 1 7 A と図 1 7 B との比較によって、エンドソーム 2 0 1 の輸送は、細胞中心から細胞膜に向かう場合と、細胞膜から細胞中心に向かう場合とでゆ

らぎ値 χ の度数分布が異なることが示される。

[0092] (変形例)

力測定装置 1 及びゆらぎ係数算出装置 2 の機能部は必ずしも異なる筐体によって実装されなくてもよく、ひとつの筐体の実装されてもよい。

[0093] なお、第二軌跡データ取得部 21 は、必ずしも、観察データに基づいて、定速移動データ及び静止データを含むタイムコースデータを取得する必要はなく、第一軌跡データ取得部 11 が取得したタイムコースデータを取得し、取得したタイムコースデータのうち定速移動データ及び静止データを含むタイムコースデータを取得してもよい。

[0094] なお、第一軌跡データ取得部 11 が取得する定速移動データを含むタイムコースデータは、観察データに基づいてユーザによって生成されてもよいし、装置によって生成されてもよい。また、第二軌跡データ取得部 21 が取得する定速移動データ及び静止データを含むタイムコースデータは、観察データに基づいてユーザによって生成されてもよいし、装置によって生成されてもよい。ゆらぎ値算出部 12 がゆらぎ値の算出に使用する定速移動データは、ユーザによって手動で選定されてもよいし、装置によって選定されてもよい。

ゆらぎ係数算出装置 2 によって使用される定速移動データ及び静止データもまた、ユーザによって手動で選定されてもよいし、装置によって選定されてもよい。また、観察対象のカーゴの選定もユーザによって手動で選定されてもよいし、装置によって選定されてもよい。

[0095] なお、画像のデータ群と、観察データとは必ずしも二次元のデータでなくともよく、三次元又は一次元のデータであってもよい。

[0096] 上述した実施形態における力測定装置 1 及びゆらぎ係数算出装置 2 をコンピュータで実現するようにしてもよい。その場合、この機能を実現するためのプログラムをコンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録して、この記録媒体に記録されたプログラムをコンピュータシステムに読み込ませ、実行することによって実現してもよい。なお、ここでいう「コンピュータシステム

」とは、OSや周辺機器等のハードウェアを含むものとする。また、「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、フレキシブルディスク、光磁気ディスク、ROM、CD-ROM等の可搬媒体、コンピュータシステムに内蔵されるハードディスク等の記憶装置のことをいう。さらに「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、インターネット等のネットワークや電話回線等の通信回線を介してプログラムを送信する場合の通信線のように、短時間の間、動的にプログラムを保持するもの、その場合のサーバやクライアントとなるコンピュータシステム内部の揮発性メモリのように、一定時間プログラムを保持しているものも含んでもよい。また上記プログラムは、前述した機能の一部を実現するためのものであってもよく、さらに前述した機能をコンピュータシステムにすでに記録されているプログラムとの組み合わせで実現できるものであってもよく、FPGA (Field Programmable Gate Array)等のプログラマブルロジックデバイスを用いて実現されるものであってもよい。

[0097] 上述した各実施形態では、本発明を力測定装置として表現したが、本発明は、力測定方法として表現することもできる。この場合、実施形態における力測定装置に対応した本発明による力測定方法は、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得ステップと、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出ステップと、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出ステップと、を有する力測定方法として表現することができる。

[0098] 上記の実施形態における力測定装置に対応した力測定方法において、第一取得ステップは、実施形態における第一軌跡データ取得部11の動作または

処理に相当し、ゆらぎ値算出ステップは、実施形態におけるゆらぎ値算出部 1 2 及び繰り返し制御部 1 3 の動作または処理に相当する。また、力算出ステップは、実施形態における力算出部 1 6 の動作または処理に相当する。

[0099] なお、実施形態における第二軌跡データ取得部 2 1 の動作または処理は、第二取得ステップの一例であり、実施形態におけるゆらぎ係数算出部 2 3 の動作または処理はゆらぎ係数算出ステップの一例である。

なお、第一軌跡データ取得部 1 1 は、第一取得部の一例である。なお、第二軌跡データ取得部 2 1 は、第二取得部の一例である。なお、定速移動データは第一のデータの一例である。なお、静止データは第二のデータの一例である。

[0100] 以上、この発明の実施形態について図面を参照して詳述してきたが、具体的な構成はこの実施形態に限られるものではなく、この発明の要旨を逸脱しない範囲の設計等も含まれる。

符号の説明

[0101] 1 …力測定装置、 2 …ゆらぎ係数算出装置、 1 1 …第一軌跡データ取得部、 1 2 …ゆらぎ値算出部、 1 3 …繰り返し制御部、 1 4 …クラスタリング部、 1 5 …ゆらぎ係数記憶部、 1 6 …力算出部、 2 1 …第二軌跡データ取得部、 2 2 …粘性係数算出部、 2 3 …ゆらぎ係数算出部、 1 0 0 …力測定システム

請求の範囲

- [請求項1] 非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得ステップと、
- 前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出ステップと、
- 算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出ステップと、
- を有する力測定方法。
- [請求項2] 前記力算出ステップは、前記ゆらぎ値に対してクラスタリングを行うことで前記力を算出する、
- 請求項1に記載の力測定方法。
- [請求項3] 非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータのうち、前記第一のデータと、前記カーゴの位置が時間によらず略同一の位置である期間の前記カーゴの位置の時間変化を示す第二のデータとを含むタイムコースデータを取得する第二取得ステップと、
- 前記力と前記ゆらぎ値との換算係数であるゆらぎ係数を前記第一及び第二のデータに基づいて算出するゆらぎ係数算出ステップと、
- を有する請求項1又は2に記載の力測定方法。
- [請求項4] 前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記第二のデータに基づいて、前記カーゴを囲む媒質の粘性係数を算出する、
- 請求項3に記載の力測定方法。
- [請求項5] 前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記第二取得ステップにおいて取

得された前記第一のデータに基づいて、前記カーゴが移動する速さを算出する請求項4に記載の力測定方法。

[請求項6] 前記ゆらぎ係数算出ステップは、前記粘性係数と前記速さとに基づいて前記ゆらぎ係数を算出する、
請求項5に記載の力測定方法。

[請求項7] 前記ゆらぎ値算出ステップは、前記位置の変化量を ΔX とし、前記単位時間における ΔX の値が ΔX_1 である確率を第一の確率 $P_1(\Delta X_1)$ とし、前記ゆらぎ値を χ とした場合に、 $\chi = \ln [P_1(\Delta X_1) / P_1(-\Delta X_1)] / \Delta X_1$ の式によって χ を算出する、
請求項1に記載の力測定方法。

[請求項8] 非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得部と、
前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出部と、

算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出部と、
を備える力測定装置。

[請求項9] 非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得する第一取得部と、

前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質

が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出するゆらぎ値算出部と、

算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出する力算出部と、
を備える力測定システム。

[請求項10]

コンピュータに、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得させ、

前記コンピュータに、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出させ、

前記コンピュータに、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出するための力測定プログラム。

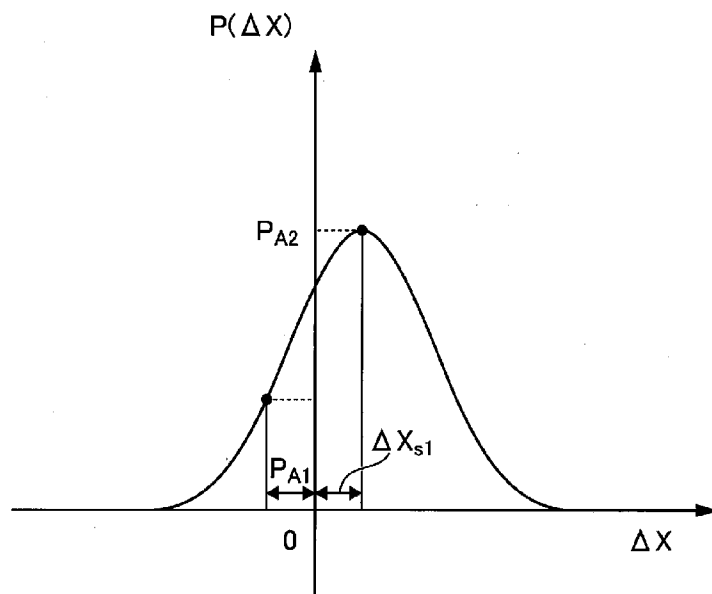
[請求項11]

コンピュータに、非侵襲的な手段によって取得したカーゴの移動の軌跡を示すタイムコースデータに含まれるデータのうち、カーゴの単位時間の変位が略一定である期間におけるカーゴの位置の時間変化を示す第一のデータを取得させ、

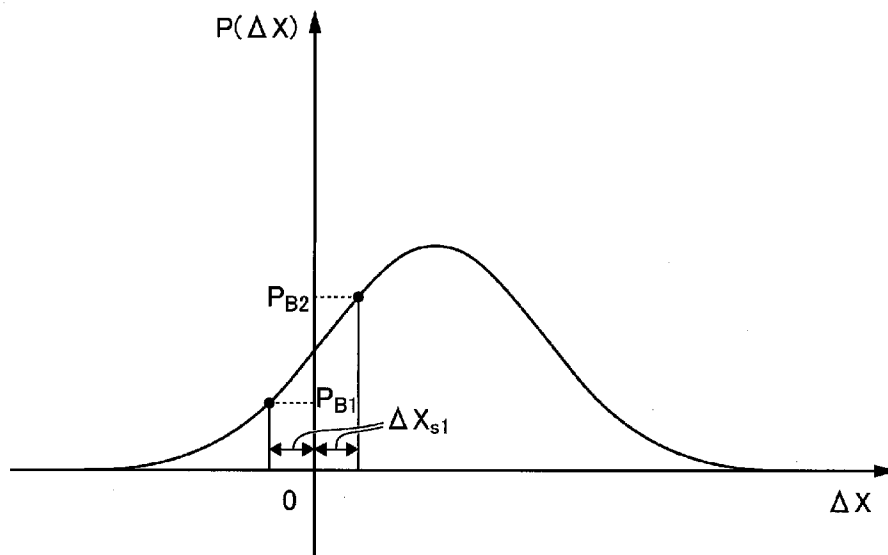
前記コンピュータに、前記第一のデータに基づく確率分布であって、単位時間における前記カーゴの所定の位置の変化量が所定の量である確率の分布を示す第一の確率分布に基づいて、前記カーゴを輸送するモータータンパク質が前記カーゴにくわえる力に比例するゆらぎ値を算出させ、

前記コンピュータに、算出した前記ゆらぎ値に基づいて、前記力を算出させるためのプログラムを記憶する記録媒体。

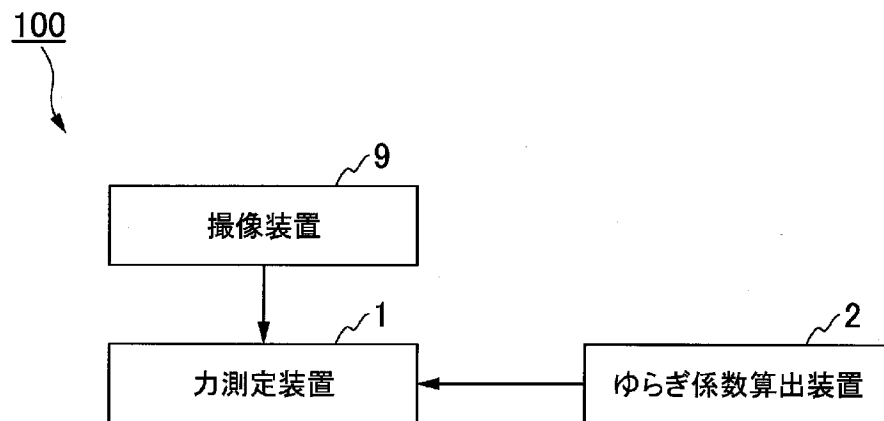
[図1A]



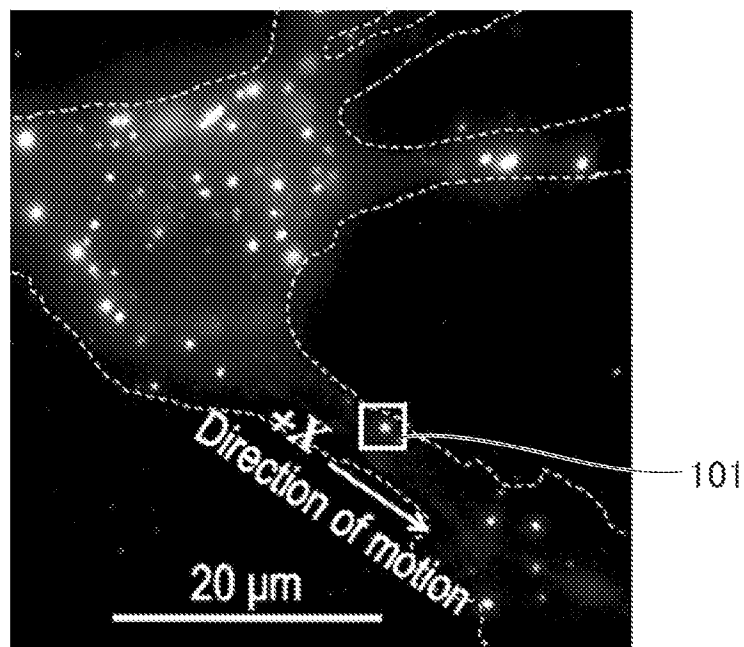
[図1B]



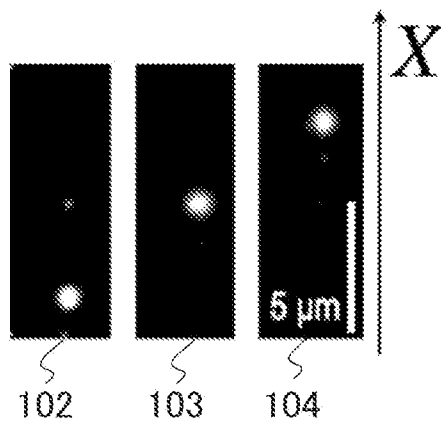
[図2]



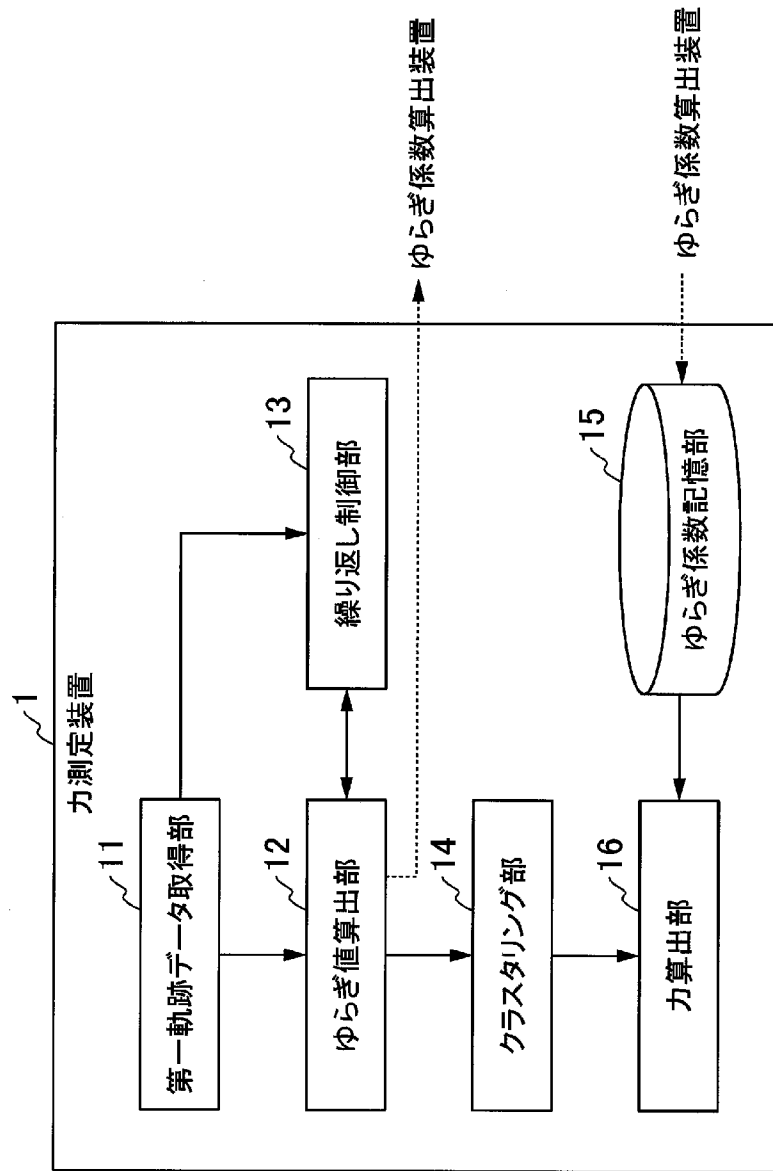
[図3]



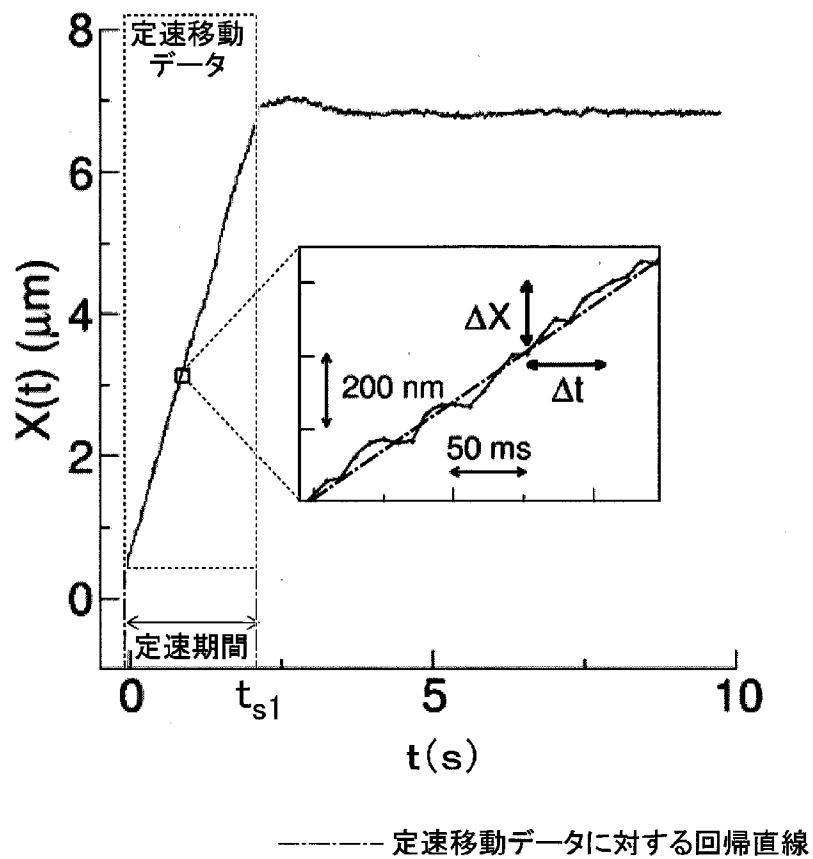
[図4]



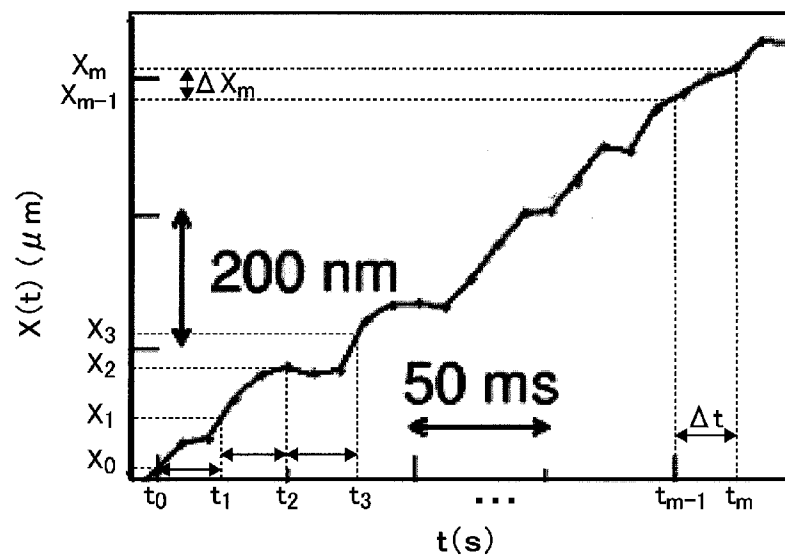
[図5]



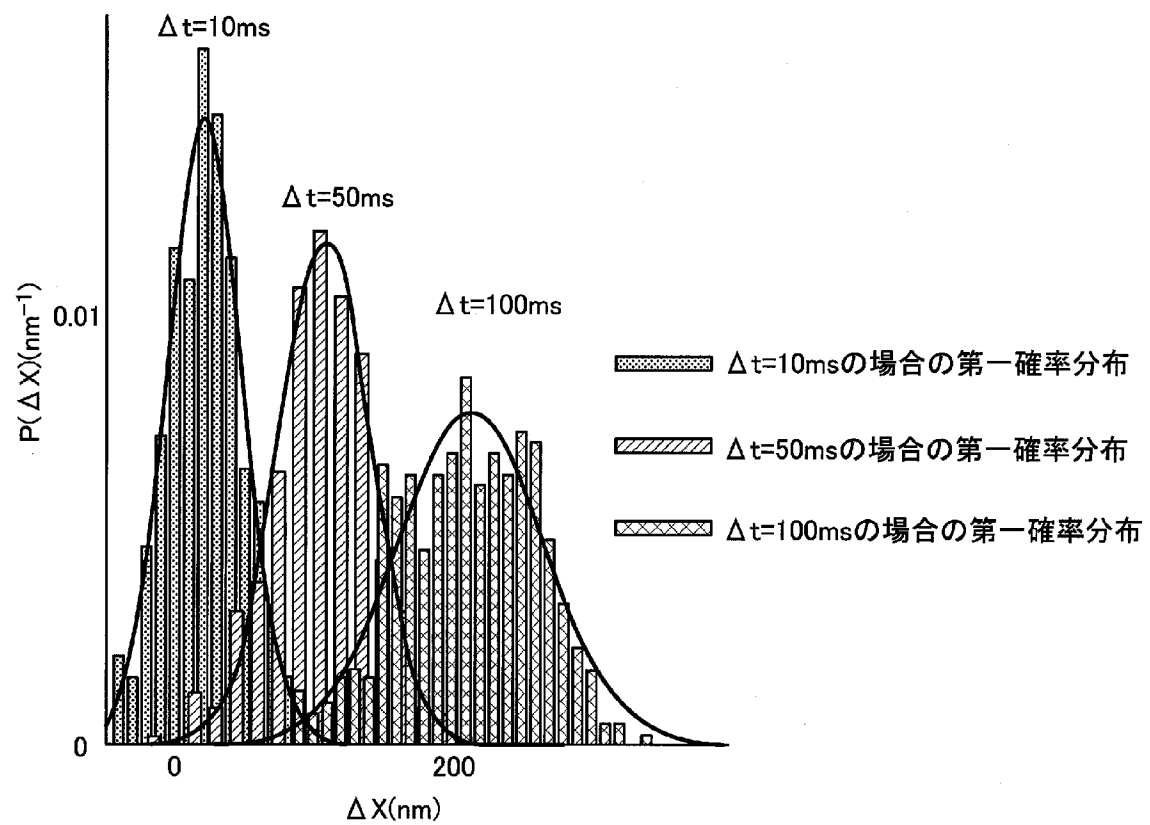
[図6]



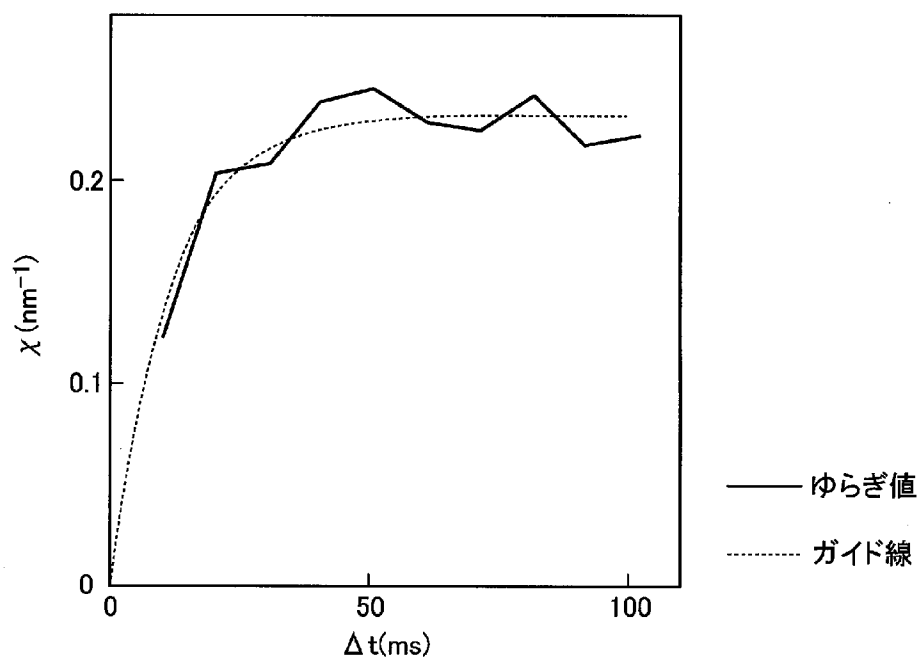
[図7]



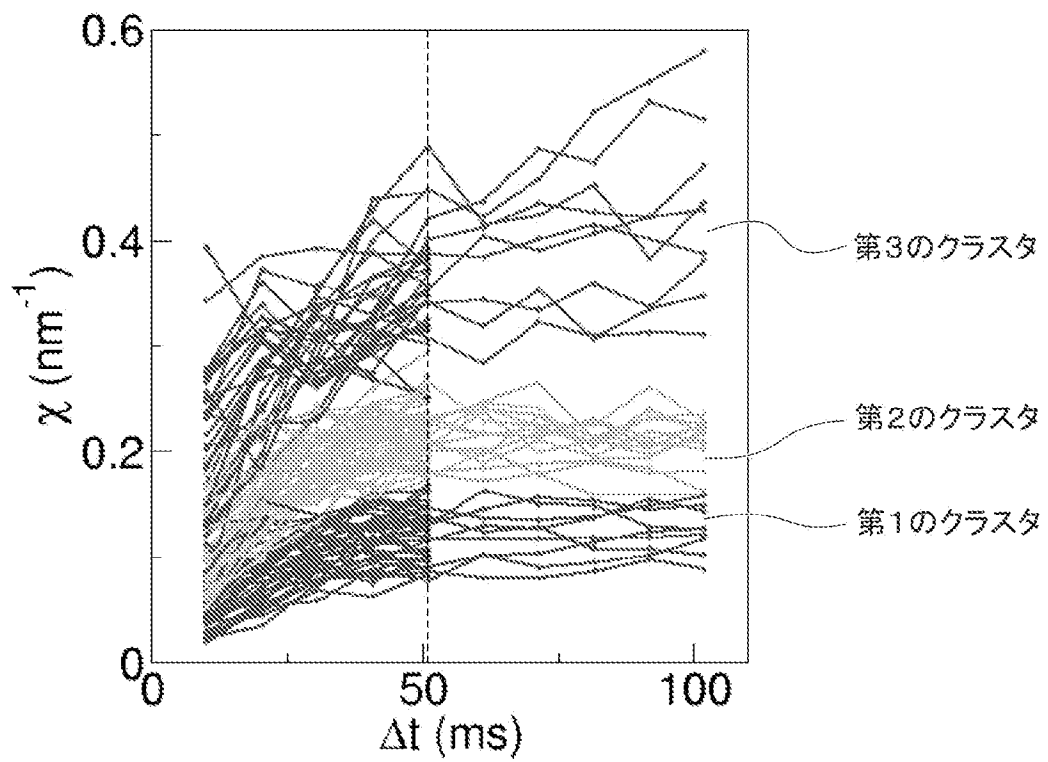
[図8]



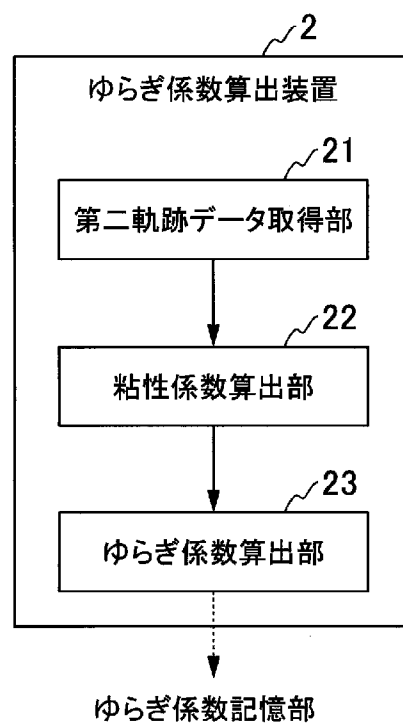
[図9]



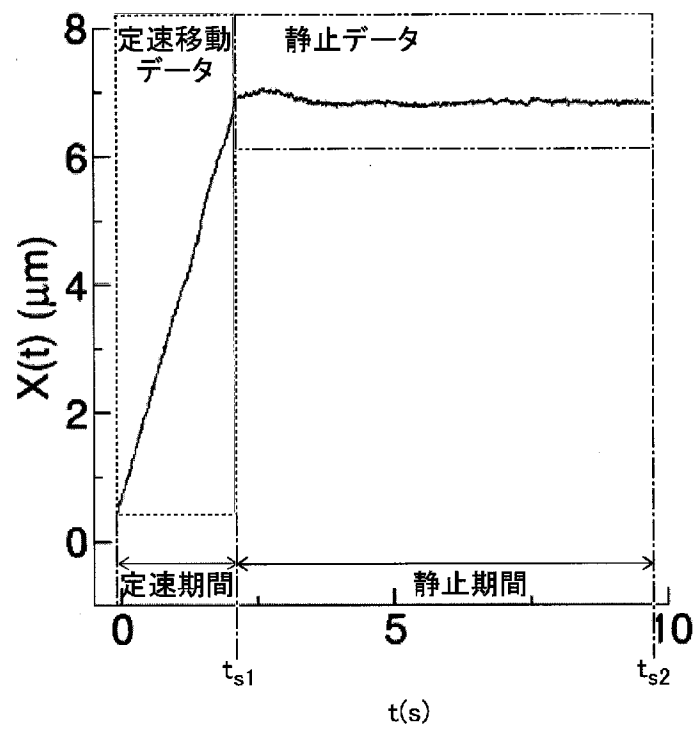
[図10]



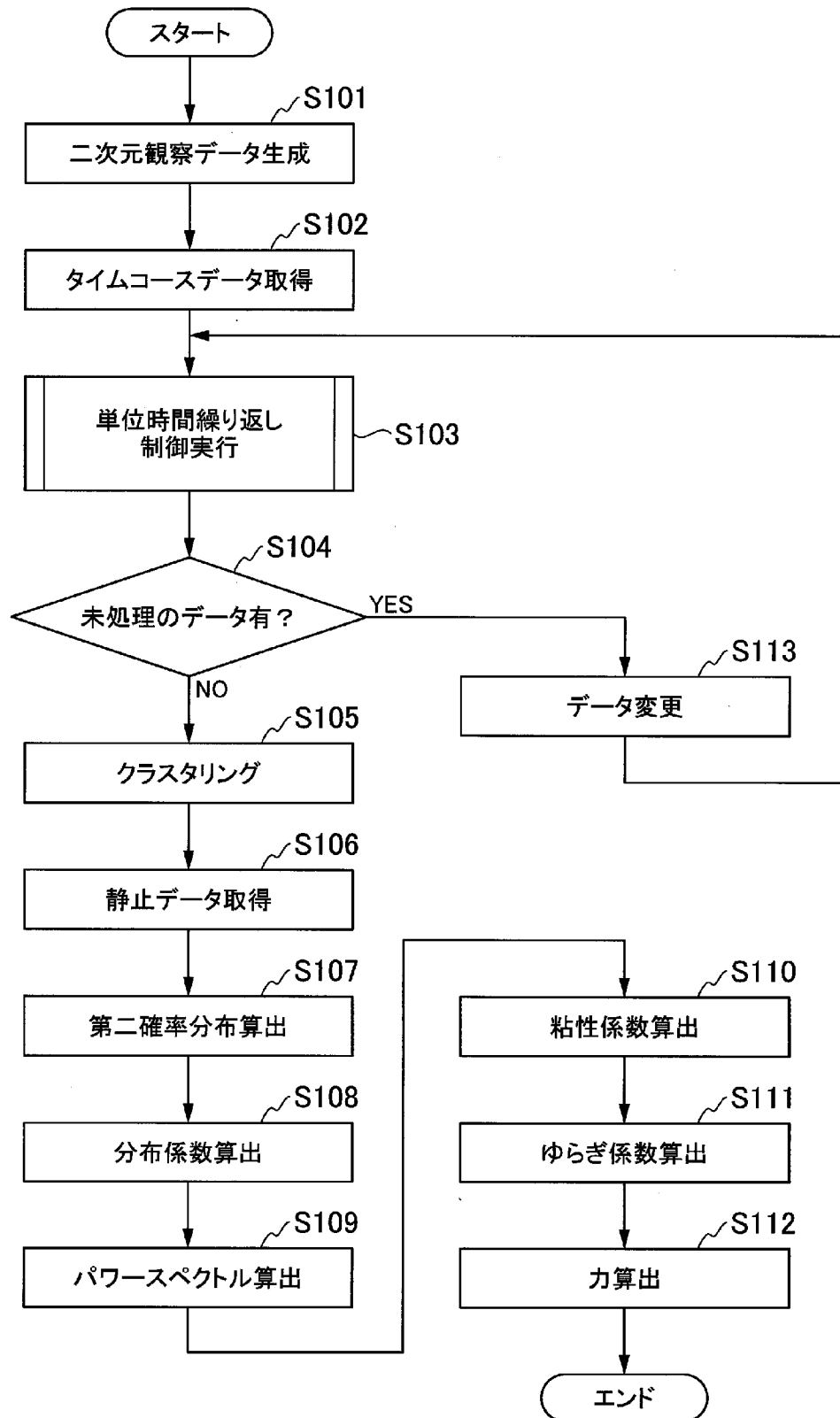
[図11]



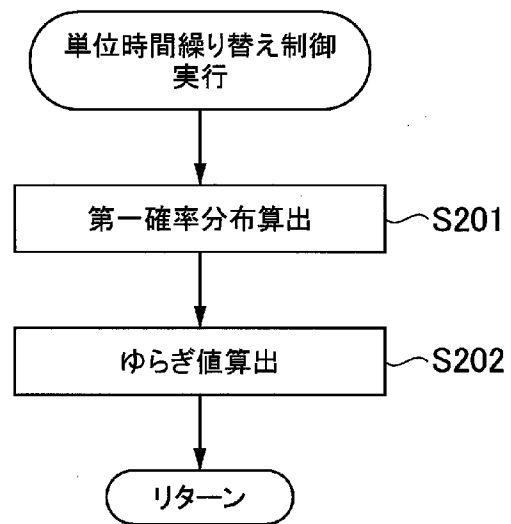
[図12]



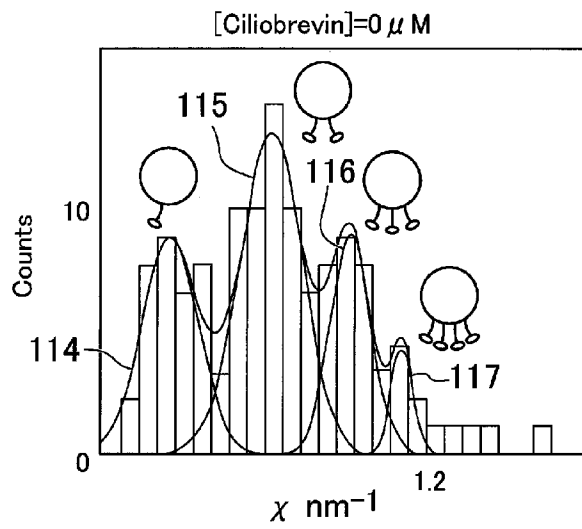
[図13]



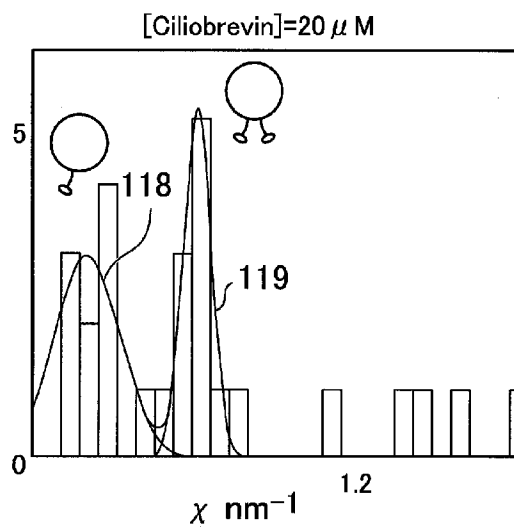
[図14]



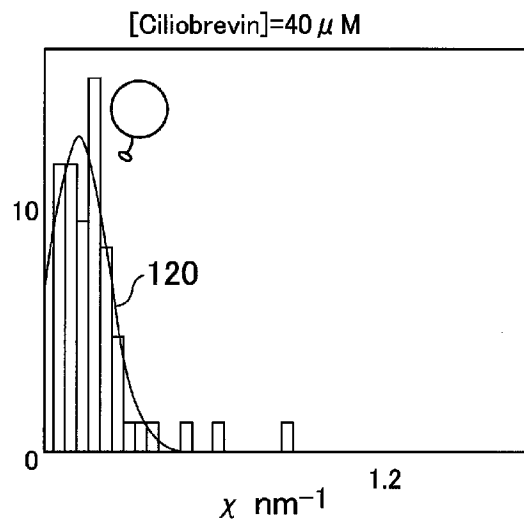
[図15A]



[図15B]

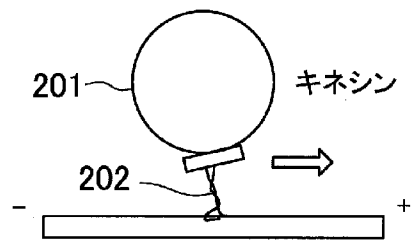


[図15C]



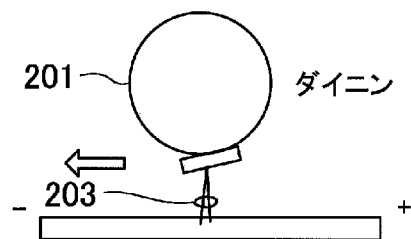
[図16A]

+端方向輸送(細胞中心→細胞膜)

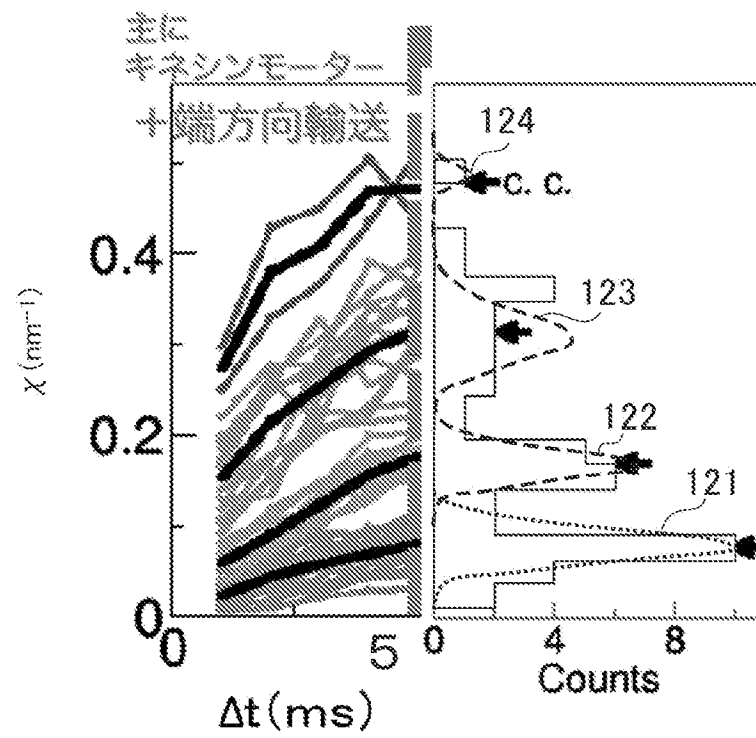


[図16B]

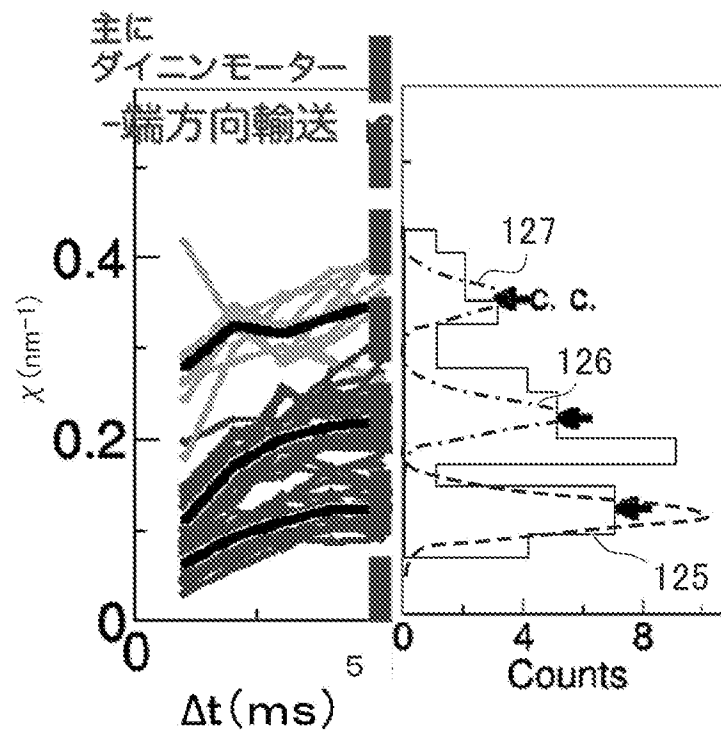
-端方向輸送(細胞中心→細胞膜)



[図17A]



[図17B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/040300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. G01L1/00 (2006.01) i, C12M1/34 (2006.01) i, C12Q1/02 (2006.01) i, G01L5/00 (2006.01) i, G01N21/85 (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)

Int. Cl. G01L1/00, C12M1/34, C12Q1/02, G01L5/00, G01N21/85, G01N33/483

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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.
A	US 2014/0067342 A1 (NUMERICA CORPORATION) 06 March 2014, fig. 5A, 5B (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
19.11.2018

Date of mailing of the international search report
27.11.2018

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. G01L1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01L5/00(2006.01)i,
G01N21/85(2006.01)i, G01N33/483(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. G01L1/00, C12M1/34, C12Q1/02, G01L5/00, G01N21/85, G01N33/483

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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）

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
A	US 2014/0067342 A1 (NUMERICA CORPORATION) 2014.03.06, FIG. 5A, FIG. 5B (ファミリー無し)	1-11

☐ 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 | 「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 | |

国際調査を完了した日

19.11.2018

国際調査報告の発送日

27.11.2018

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）

森 雅之

電話番号 03-3581-1101 内線 3216

2 F

8505