

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年9月28日 (28.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/101051 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12M 1/34 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/305403
- (22) 国際出願日: 2006年3月17日 (17.03.2006)
- (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2005-080095 2005年3月18日 (18.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社エフェクター細胞研究所 (EFFECTOR CELL INSTITUTE, INC.) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場 1-33-8 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新田 尚 (NITTA, Nao) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場 1-33-8 株式会社エフェクター細胞研究所内 Tokyo

(JP). 金ヶ崎 士朗 (KANEGASAKI, Shiro) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場 1-33-8 株式会社エフェクター細胞研究所内 Tokyo (JP). 山内 明 (YAMAUCHI, Akira) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場 1-33-8 株式会社エフェクター細胞研究所内 Tokyo (JP).

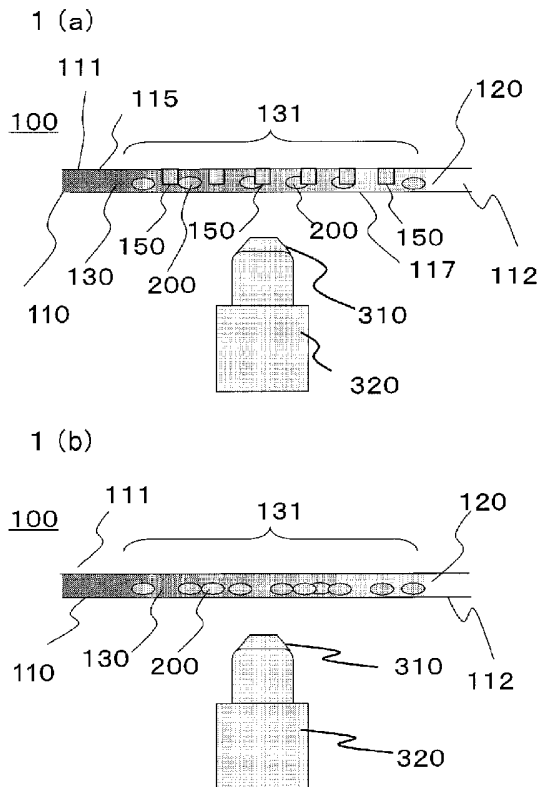
(74) 代理人: 特許業務法人 湘洋内外特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY SHOWYOU INTERNATIONAL); 〒2200004 神奈川県横浜市西区北幸二丁目 9-10 横浜HSビル7階 Kanagawa (JP).

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: CELL OBSERVATION AIDING INSTRUMENT AND METHOD OF CELL OBSERVATION THEREWITH

(54) 発明の名称: 細胞観察支援器具、および、それを用いた細胞観察方法



(57) Abstract: A cell observation aiding instrument including opposed first surface member (115) and second surface member (117) and, positioned therebetween, stopper (150) for inhibiting cell migration. The first surface member (115) and the second surface member (117) define, disposed between opposite surfaces thereof, cell accommodation space (110) for accommodating multiple cells in a migration permitting fashion. At least one of the first surface member (115) and second surface member (117) is a member permitting optically observing of the interior of the cell accommodation space (110) from outside. At least one stopper (150) is disposed in the cell accommodation space (110).

(57) 要約: 対向する第1面部材115および第2面部材117と、第1面部材115および第2面部材117間に位置し、細胞の移動を阻止するストップ150と、を有する。第1面部材115と第2面部材117とは、それらの対向する面の間に、複数個の細胞を移動可能に収容する細胞収容空間110を構成する。第1面部材115および第2面部材117のうち少なくとも一方は、外部から細胞収容空間110内を光学的に観察できる部材である。ストップ150は、細胞収容空間110内に1個以上、配置される。

WO 2006/101051 A1



(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

細胞観察支援器具、および、それを用いた細胞観察方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞の観察に用いられる細胞観察支援器具、および、それを用いた細胞観察方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞を光学的に観察するための細胞観察支援器具が存在する(非特許文献1)。この器具は、例えば、ガラス板と、エッチングにより彫り込みを設けたシリコンチップとを対向させ、両者の対向面間に細胞収容領域を構成したものである。細胞収容空間内に、細胞を平面的に分散させて、ガラス板を通して、顕微鏡などの光学観察装置により観察できるように構成される。

[0003] この細胞観察支援器具を用いることにより、例えば、細胞の運動能力、刺激物質に対する反応、刺激物質の濃度勾配による影響等の観察を行うことができる。

[0004] ところで、細胞観察を行う際、細胞が観察視野内に分散配置され、且つ、それぞれの位置で固定された状態に置かれて観察することが要望されている。そのための装置として、特許文献1に挙げられる技術がある。この技術は、細胞収容空間を構成する面部材の一方に、吸引用の貫通孔を設け、各貫通孔を吸引装置につないで吸引させることで、細胞を観察面上に配置、固定するものである。

[0005] 非特許文献1: Kanegasaki S et al., (2003) J. Immunol. Methods 282, 1-11

特許文献1: 特許2747304号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] ところで、細胞の観察に際しては、細胞を傷つけない状態で、位置を変えず観察を継続することが求められる場合がある。非特許文献1に記載される技術は、細胞が、細胞を収容している空間を満たす液体の動きに応じて動いてしまうこと、また、刺激物質の存在に応じて、細胞が特定の方向に移動してしまうことなどの場合に、細胞の固定が難しい。一方、特許文献1に記載される技術は、細胞を貫通孔において吸引

することで、観察面に分散することができる。さらに細胞収納空間の深さが細胞の径よりも十分に浅ければ、摩擦によって細胞を細胞収納空間の内部ないし端部に固定することもできる。しかし、細胞を2次元的に分散させようとする、細胞がランダムに配置されてしまう。細胞の分散を制御することは困難であるため、繰り返し実験をする場合などにおいては、実験ごとに細胞の配置が異なってしまう。さらに、細胞収納空間に細胞の刺激物質を投与する場合、その刺激物質の拡散や流動性は、細胞の分布によって影響を受ける。このため、細胞の配置がランダムであると、各細胞に作用する刺激物質の濃度を予測することが非常に困難となる。また、摩擦抵抗のある空間で細胞を吸引により移動させるため細胞に大きな負荷がかかる、という問題も考えられる。

[0007] 本発明は、細胞を収容する空間を満たす液体の流れや物質の拡散に影響与えずに、また、細胞に大きな負荷を与えずに、細胞を所望の位置に再現性よく配置した状態で観察ができるよう支援する技術を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明によれば、  
対向する第1の面部材および第2の面部材と、  
前記第1の面部材および第2の面部材間に位置し、細胞の移動を阻止するストップと、を有し、  
前記第1の面部材と第2の面部材とは、それらの対向する面の間に、複数個の細胞を移動可能に収容する細胞収容空間を構成し、  
前記第1の面部材および第2の面部材のうち少なくとも一方は、外部から前記細胞収容空間内を光学的に観察できる部材であり、  
前記ストップは、前記細胞収容空間内に1個以上、配置されることを特徴とする細胞観察支援器具が提供される。

[0009] また、本発明によれば、  
対向する第1の面部材および第2の面部材により構成される細胞収容空間に液体を満たし、該液体中に細胞を導入し、第1の面部材および第2の面部材のうち透明な部材を通して細胞を光学的に観察する細胞観察方法において、

前記第1の面部材および第2の面部材間に、細胞の移動を阻止するストップを1個以上配置し、

細胞収容空間内に複数個との細胞を導入し、前記いずれかのストップにより移動が阻止された細胞を観察対象とすること  
を特徴とする細胞観察方法が提供される。

[0010] ストップは、少なくとも1個の細胞の通過を阻止する大きさの柱状の構造体を有し、前記柱構造体には、細胞を通過させないが、液体を通過させる液体通過部を有する構成とすることができる。

[0011] 柱構造体は、細胞の流れの上流側に向かって凹となる湾曲部を有する構成とすることができる。

[0012] ストップは、その高さが、前記第1の面部材と第2の面部材との間隔と等しいとすることができる。あるいは、その高さが、前記第1の面部材と第2の面部材との間隔より短い構成とすることができる。また、ストップは、その高さが、対象とする細胞の直径相当とすることができる。

[0013] ストップは、複数個が行方向に少なくとも1行、配置される構成とすることができる。

[0014] ストップは、複数個のストップを複数行、千鳥配置に配置する構成とすることができる。

#### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1(a)は本発明の一実施形態に係る細胞観察支援器具の概略構成を示す説明図、図1(b)は本実施形態の機能を明確にするための比較例を示す説明図である。

[図2]図2(a)および図2(b)は本発明の実施形態における細胞をトラップするためのストップの一例を底面側から見た状態の斜視図。

[図3]図3(a)から図3(c)は、本発明の実施形態において、ストップによる細胞移動阻止の原理を示す説明図である。

[図4]図4(a)から図4(e)は、本発明の実施形態において用いられるストップの各種形態を示す平面図である。

[図5]図5(a)は、本発明の実施形態において用いられる、ストップの他の形態を示す説明図、図5(b)は、そのストップによる2個の細胞の捕捉状態を示す説明図である。

[図6]図6(a)から図6(c)は、複数個のストップの配置を示す説明図である。

[図7]図7(a)および図7(b)は、連結型ストップの例を示す説明図である

[図8]図8(a)から図8(c)は、連結型ストップの配置例を示す説明図である。

[図9]図9は、本発明の実施に用いることができる細胞観察支援器具の第1の例を示す断面図である。

[図10]図10は、本発明の実施に用いることができる細胞観察支援器具の第2の例を示す断面図である。

[図11]図11は、本発明の実施に用いることができる細胞観察支援器具の第3の例を示す断面図である。

[図12]図12は、本発明の実施に用いることができる細胞観察支援器具の第4の例を示す断面図である。

[図13]図13は、本発明の実施に用いることができる細胞観察支援器具の第5の例を示す断面図である。

[図14]図14(a)および図14(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図15]図15(a)および図15(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図16]図16(a)および図16(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図17]図17(a)および図17(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図18]図18(a)および図18(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図19]図19(a)および図19(b)は、本実施形態の細胞観察支援器具を用いた実施例における細胞投入前後の観察写真を示す説明図である。

[図20]図20(a)は、図4(e)に示すストップの拡大図、図20(b)は、そのストップを複数個配置した分布を示す説明図である。

[図21]図21は、本発明の細胞観察支援器具を用いて観察を行う際に用いることができる細胞計測システムの構成の一例を示すブロック図である。

## 符号の説明

[0016] 100…細胞観察支援器具、110…細胞収容空間(チャンネル)、111…ソース領域、112…ドレイン領域、113、113a…第1液溜空間、114、114a2…第2液溜空間、113b…第3液溜空間、114b…第4液溜空間、115…シリコンウェハ、117…ガラス基盤、120…液体、130…刺激物質(刺激剤)、150…ストップ、151a、151b…柱構造体、151c…スリット、200…細胞、310…顕微鏡、320…デジタルカメラ(CCDカメラ)、350…コンピュータ。

## 発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明の実施形態について図1(a)および図1(b)を参照して説明する。図1(a)は本発明の原理を示す図である。一方、図1(b)は比較例を示す図である。

[0018] 図1(a)に示すように、本実施形態では、複数の細胞が配置された空間に、細胞の反応を見るための特定の物質についての濃度勾配を形成する。そのため、細胞観察支援器具100により、細胞を収容する空間として細胞収容空間110が形成される。図1(a)に示す細胞収容空間110は、原理の説明をするため、その構造を模式的に示す。具体的な構成については後述する。

[0019] この細胞収容空間110に、細胞に無害な液体120を満たし、この中に、観察したい細胞200を、複数個(細胞群)、分散させて配置する。この状態で、細胞の反応を見るための物質(以下、刺激物質という)130を、細胞収容空間110の一方であるソース領域111から注入する。この例では、細胞収容空間110内にソース領域111側からドレイン領域112側に向かって濃度が低下する濃度勾配131を形成させる。例えば、化合物等の刺激物質130を溶解した溶液を注入し、細胞収容空間110に特定の刺激物質130の濃度勾配131が形成された状況において、各細胞200の状態を、顕微鏡310を介して、デジタルカメラ(例えば、CCDカメラ)320により撮像する。なお、本実施形態では、細胞収容空間110をシリコンウェハ上にフォトリソグラフ技術を用いて複数個(例えば、12個)形成する。そして、それぞれの細胞収容空間110における濃度勾配の各位置における細胞の応答性を計測する。この方法により、化合物の細胞に対する作用の比較を容易に行うことが可能となる。

[0020] 刺激物質に対する細胞の応答性は、濃度に応じて異なる。細胞が示す応答として

、例えば、遺伝子発現、形態変化、生理活性物質の放出など、様々な細胞現象が考えられる。これの応答として、細胞は、外部から観察できる何らかの特徴量を示す場合がある。本発明では、この性質を利用して、細胞群が示す特徴量を細胞群の画像を解析することにより抽出して、刺激物質に関する細胞の応答に関する情報を、取得する。本発明の場合、同じ画面内に、濃度勾配が形成される。このため、濃度を変えては、実験を繰り返すといった試行錯誤による手間を要しない。1回の実験で濃度の違いによる応答を観察することができる。

[0021] あるいは別の実施形態として、ソース領域111ないし112より液体に対して加圧ないし減圧の制御を加えることにより、細胞収納空間110内の液体120を連続的、断続的あるいは単発的に流すことができる。これにより細胞周辺の液体を循環させることで長時間細胞を観察することができる。あるいは細胞収納空間に流入する液体に対して適当な物質を混入させることで、時間を指定して、細胞に対して物質による刺激を与えることができる。本発明では、これらの場合における細胞群の画像を取得し、解析することも可能とする。

[0022] ここで、図1(a)と図1(b)とを比較する。図1(a)に示す細胞観察支援器具100では、細胞収容空間110内に、ストップ150が適当な間隔で複数個配置されている。そのため、いくつかの細胞200がストップ150によりその位置から移動しないように、移動が阻止されている。図1(a)の場合には、図面左側のソース領域111からドレイン領域112に向かって細胞が移動する途中で、細胞群のいずれかが、いずれかのストップ150に当接して、ソース領域112側への移動を阻止される状態が示されている。

[0023] 一方、図1(b)に示す細胞観察支援器具100では、ストップ150が設けられていない。その他の構成は、図1(a)に示すものと同じである。両者を比較すると、図1(a)に示す細胞観察支援器具においては、一部の細胞200の移動がストップ150により阻止され、細胞収容空間110内での細胞の分布に違いがみられることが分かる。

[0024] 次に、ストップの構造について、図2(a)から図3(c)を参照して説明する。なお、本実施形態では、図1(a)に示すように、細胞観察支援器具100の下方側から顕微鏡により観察する構造としたものを例としている。ただし、図示の便宜上、以下の説明では、底面を上に向けた状態のストップについて説明する。



[0025] 図2(a)および図2(b)に示すように、対向する第1の面部材115および第2の面部材117との間にストップ150が配置される。本実施形態の場合、第1の面部材115にストップ150が設けられる。ストップ150の情報に若干の空間を保って、第2の面部材117が配置される。第1の面部材115は、例えば、半導体ウェハ、より具体的には、シリコンウェハにより構成される。シリコンウェハをエッチング等の加工技術を使って彫り込み、ストップ150その他の突起物を残して、彫り込み部分を形成する。この彫り込み部分が、細胞収容空間110の多くの部分を構成する。従って、本実施形態では、ストップ150は、第1の面部材115と一体に構成されている。もちろん、ストップと、第1面部材115および第2面部材117のいずれとも別体に形成して、いずれかの面、例えば、第1面部材115に貼り付けるなどによって固定することにより、形成することができる。

[0026] 第1の面部材115、第2の面部材117およびストップ150は、いずれも、他の材料により形成することができる。例えば、ガラス、プラスチックが挙げられる。第1の面部材115および第2の面部材117のうち、いずれかが透明で、光学的観察が可能であればよい。

[0027] ストップ150は、典型的な構造として、図2(a)および図2(b)に示すように、細胞が通過できない幅の液体通過部を構成するスリット151cと、これを挟んで、細胞を保持する柱構造体151aおよび151bとを有する。柱構造体151aおよび151bの高さは、第1面部材115と第2面部材117との間隔と等しいか、これより短い。柱構造体151aおよび151bの高さを、第1面部材115と第2面部材117との間隔より短くすると、細胞収容空間110での液体の流れを阻害しにくい。また、第1面部材115と第2面部材117との間隔は、細胞の直径と同程度か、これより大きい。また、柱構造体151aおよび151bは、第1面部材115上面と平行な面で見ると、全体として湾曲する構造となっている。湾曲は、細胞が流れる方向の上流側に向かって凹となる向きに湾曲している。柱構造体151aおよび151bの端から端までの長さ、例えば、湾曲している弧の長さまたは弦の長さは、想定する細胞の直径を超える程度の大きさを想定している。その結果、細胞が捕捉されて、外れにくい細胞保持領域151tが構成される。スリット151cは、細胞が通過することは困難であるが、液体は通過できる幅となるように設けられ

ている。スリット151は、開口断面が長方形である必要はない。

- [0028] これにより、液の流れを確保すると共に、細胞の捕捉を容易にしている。すなわち、図3(a)から図3(c)に示すように、細胞懸濁液を通過させると、液体はストップ151のスリット151cの間を通過するが、細胞200は通過できないため、細胞200はスリット151cに吸い付けられ、ストップ151に保持される。この場合、液の流れに乗って、細胞が移動し、柱構造体151aおよび151bに近接して、細胞が柱構造体151aおよび151bに接触寸前になっても、細胞と柱構造体151aおよび151bとの間の液体が、スリット151cから外に流れるため、液体による細胞の捕捉の障害が生じず、捕捉を容易にしている。
- [0029] 一方、一つの細胞がストップ150に捕捉されると、その細胞がスリット151cをふさぐことによって、ストップ151の細胞保持領域151tへの液体の流れをある程度遮断することから、第2の細胞が該ストップ151にさらに吸い寄せられることを抑制する効果が生まれる。これにより、細胞を各ストップに一つずつ配置するのを助ける効果が生まれる。なお、ストップの形状、細胞の大きさによっては、同一のストップに、複数の細胞が捕捉されることが起こり得る。
- [0030] なお、液体通過部としては、前述したスリットに限られない。貫通孔、切り欠き等により構成することができる。
- [0031] 次に、ストップの構造のバリエーションについて、図4(a)から図5(b)を参照して説明する。
- [0032] 図4(a)に示すストップは、前述した図2(a)から図3(c)に示すものと同じであり、両手を広げて物を受け取る構造となっている。この場合には、半円形状を基本としている。
- [0033] 図4(c)に示すストップ152は、細胞保持領域152tが、図4(a)に示すストップ151の細胞保持領域151tよりも浅いという特徴がある。その結果、ストップの底面積を小さくすることができる。構造としては、柱構造体152a、152b、およびスリット152cとを有する。
- [0034] 図4(c)に示すストップ153は、柱構造体153aおよび153bと、スリット153cとを有し、基本的な構造は、図4(a)に示すものと同様である。ただ、本例のストップ153は、

柱構造体153aおよび153bの両端間の幅が長く、さらに、深く湾曲した状態になっている。そのため、一旦捕捉した細胞が外れにくいという利点がある。ただし、細胞保持領域153tが大きくなるため、複数の細胞を捕捉することが起こる可能性がある。

[0035] 図4(d)に示すストップ154は、柱構造体154aおよび154bと、スリット154cとを有し、基本的な構造は、図4(c)に示すものと同様である。ただ、本例のストップ154は、柱構造体154aおよび154bの両端間の長さが長く、さらに、深く湾曲した状態になっている。そのため、細胞の入口も狭くなっており、捕捉した細胞が外れにくいという利点がある。

[0036] 図4(e)に示すストップ155は、柱構造体155aおよび155bと、スリット155cとを有し、基本的な構造は、図4(a)に示すものと同様である。ただ、本例のストップ155は、柱構造体153aおよび153bが、湾曲していない点に特徴がある。湾曲していないため、細胞の捕捉に際し、細胞の大きさに依存しにくい。そのため、サイズの異なる複数種の細胞に対して適用することができるという、汎用性が高いものである。一方、捕捉した細胞が逃げやすいという面もある。しかし、これは、洗浄した際、細胞が外れやすいので、洗浄が容易という利点にもなる。さらに柱構造体153aおよび153bと細胞とが接する面が少ないため、細胞表面が観察しやすいという利点もある。

[0037] 次に、図5(a)および図5(b)に示す2段構成のストップの例について説明する。これまでに説明したストップは、細胞保持領域151tから155tまで、細胞を1つ保持乃至捕捉することを想定した例である。しかし、観察に置いては、サイズの異なる細胞を混在させる場合がある。例えば、ある細胞と他の細胞とを融合させること等の実験を行う場合がある。このような場合に、複数の細胞を連続的に捕捉する、すなわち、両者が接触可能な状態で捕捉できるストップが必要となる。図5(a)および図5(b)に示すものは、そのためのものである。

[0038] このストップは、第2階層のストップ157と、その入口側に存在する第1階層のストップ156とを有する。第1階層のストップ156は入口側の間口が広く、また、出口が広がる構造となっている。第2階層のストップ157は、第1階層のストップ156の出口後方に置かれた状態となっている。そして、それより間口の狭い構造となっている。

[0039] 第2階層のストップ157は、柱構造体157aおよび157bと、スリット157cとを有し、

基本的な構造は、図4(a)に示すものと同様である。ただ、本例のストップ157は、柱構造体157aおよび157bが、L字形状に曲げられている点に特徴がある。これは、第1階層のストップ156の配置と、スリット156dおよび156eを形成することを容易にするためである。第2階層のストップ157は、比較的小型の細胞200Sを捕捉することが可能な構造となっている(図5(b)参照)。

[0040] 一方、第1階層のストップ156は、柱構造体156aおよび156bと、スリット156d、156eとを有し、基本的な構造は、図4(a)に示すものと同様である。ただ、間口が非常に広くなっており、小さな細胞200Sを通過させることはもとより、大きな細胞200Lを捕捉することも可能となっている。スリットは、スリット156dとスリット156eの2箇所も受けられている。これは、出口に、第2階層のストップ157を配置する結果、柱構造体156aと柱構造体157aとの間、および、柱構造体156bと柱構造体157bとの間に、スリット156dとスリット156eを構成している。

[0041] この2段構成のストップによれば、図5(b)に示すように、小型細胞200Sを先に細胞保持領域157tに捕捉し、そこに、大型細胞200Lを細胞捕捉領域156tに捕捉して、両者を接触させて、融合等の影響を観察することが可能となる。

[0042] 次に、ストップを第1面部材115上に複数配置する際の、分布パターンについて説明する。

[0043] 図6(a)に示すパターンは、図4(a)に示すストップ151を複数行、複数列千鳥配置したパターンである。パターンの要素を構成するストップ151は、すべて同一方向に向きを揃えている。その理由は、液体の流れが一方向になることを想定しているからである。千鳥配置とした理由は、捕捉されずに抜ける細胞を減らして、細胞を効率よく捕捉するためである。

[0044] 図6(a)に示すように、第1面部材115の全面にストップ151を配置することによって、各種の細胞刺激応答の検出に用いることができる。例えば、図1(a)に示したように、濃度勾配を設ける場合に、濃度勾配の各所に複数ずつ細胞を固定して、濃度勾配による細胞に対する影響を一度に調べることが可能となる。また、前述した第5図(a)に示すような2段構成のストップ156を配置することによって、刺激物質の濃度による細胞の融合への影響を一度に観察することが可能となる。

- [0045] 図6(b)および図6(c)は、ストップ151の数を減らし、ソース領域側となる位置に集中配置した例である。このような配置は、例えば、細胞を配置させた後に、細胞が特定の方向に移動する様子を観察したい場合に適している。一例を挙げると走化性因子の影響を調べる場合が挙げられる。
- [0046] なお、図6(a)から図6(c)に示す分布では、ストップ151を用いる例を示したが、これに限られない。細胞のサイズ、性質に応じて、他の構造のストップ、例えば、ストップ152から156を配置することも可能である。また、異なるサイズの細胞が混在している場合に、それぞれのサイズに適したストップを混在させることもできる。同様に、細胞の、変形の仕方の違いによっても、ストップの構造を選択して、複数種を混在させることもできる。
- [0047] 図20(b)に示すように、同図20(a)に示す形態のストップを千鳥配置することも考えられる。
- [0048] 次に、複数個のストップを連結した状態のストップ連結体を配置する例について説明する。
- [0049] 図7(a)に示す例は、基本要素として、図4(a)に示すストップと同様の構造のストップ158を用い、これを6個連結したものである。その結果、細胞保持領域158tとスリット158cとが6個、アーチ形状に並んで配置される。本実施形態のストップ連結体158は、要素ストップをただ、連結しただけではなく、全体として、湾曲した、いわゆるアーチ構成する形状となるように連結している。
- [0050] 図7(b)に示す例は、基本要素として、図4(a)に示すストップと同様の構造のストップ159を用い、これを5個連結したものである。その結果、細胞保持領域158tとスリット158cとが5個、斜めに並んで配置される。本実施形態のストップ連結体158は、要素ストップをただ、連結しただけではなく、全体として、斜めになるように連結した点に特徴がある。
- [0051] 図8(a)から図8(b)に、ストップ連結体158を複数個並べた例を示す。また、図8(c)にストップ連結体159を複数個配置した例を示す。
- [0052] 細胞収容空間110は、具体的には、図9から図13に示すような、様々な形態の細胞観察支援器具100により実現することができる。この細胞収容空間110は、細胞群

を平面上に、分散配置させて、外部から顕微鏡等を介して観察することができるようにするためのものである。そのため、扁平な構造となっている。厚さは、例えば、細胞の大きさ程度である。なお、図9から図13に示す例では、細胞主要空間が微細であるため、ストップパについての図示を省略している。

[0053] 図9に示すものは、第1面部材115としてのシリコンウェハに、フォトリソグラフ技術を用いて、細胞収容空間110となる扁平な彫り込みと、その一端側に位置し、細胞収容空間110に刺激物質を流入させるソース領域111、および、細胞収容空間110の他端側に位置し、細胞収容空間110から刺激物質を排出させるドレイン空間112となる彫り込みとが形成される。シリコンウェハ(第1面部材)115は、第2面部材117としてのガラス基盤上に載せられる。これにより、シリコンウェハ(第1面部材)115とガラス基盤(第2面部材)117に挟まれる、彫り込まれた空間が、細胞収容空間110、ソース領域111およびドレイン領域112を構成する。細胞収容空間110は、細胞が重ならない程度の深さの扁平な空間(チャンネル)となるように形成される。なお、ソース領域111およびドレイン領域112は、あくまでも、刺激物質の注入側と排出側とを便宜上名付けているにすぎない。対称的な細胞観察支援器具の場合、ソース領域とドレイン領域とがいずれの側になっても差し支えない。

[0054] シリコンウェハ(第1面部材)115の上面側には、液溜を構成する液溜構成部材116が設けられる。液溜構成部材116は、例えば、ステンレススチール等の金属で構成される。この液溜構成部材116により、第1液溜空間113aおよび第3液溜空間113bと、第2液溜空間114aおよび第4液溜空間114bとが形成される。第1液溜空間113aおよび第3液溜空間113bは、ソース領域111に連通している。一方、第2液溜空間112および第4液溜空間114は、ドレイン領域112に連通している。このような構造であることにより、液体120は、細胞収容空間110を通じて、第1液溜空間113aおよび第3液溜空間113bと、第2液溜空間114aおよび第4液溜空間114bとの間で行き来することができる。ただし、液体自体は、本実施形態では、流れを作らない方が観察には都合がよいため、液溜構成部材116の上方において、第1液溜空間113aおよび第3液溜空間113bと、第2液溜空間114aおよび第4液溜空間114bとを連通させる連通部118が設けてある。液体120を連通部118まで達するように入れることによ

って、液体120に圧力差による流れができることを抑制することができる。

- [0055] 細胞、刺激物質等は、注射器などを用いて注入する。この際、注射針を、ソース領域111に達する状態とすることによって、細胞収容空間110に確実に注入することができる。細胞注入後にソース領域112より液体120を吸引することにより、注入した細胞を細胞収容空間110へ導入することができる。さらに細胞収容空間110に適当なストッパがあれば、細胞はそこへ固定される。
- [0056] 図10に、図9に示す構成とほぼ同等の構成を有する細胞観察支援器具100を示す。この細胞観察支援器具100は、第1面部材115としてのシリコンウェハにおいて形成される彫り込み構造に相違がある他は、前述した図9に示すものと同様の構造を有し、同様に機能する。
- [0057] 図11に示す細胞観察支援器具は、前述した図9および図10に示す細胞観察支援器具において設けられている第3液溜空間113bおよび第4液溜空間114bを持たない構造となっている。すなわち、第1液溜空間113と、第2液溜空間114と、ソース領域111と、細胞収容空間110と、ドレイン領域112と、を有する構造となっている。
- [0058] なお、図9および図10の細胞観察支援器具100において、第3液溜空間113bおよび第4液溜空間114bを設けている理由は、注入されている液体の揺れを吸収するためである。特に、ソース領域111から離れた位置で、刺激物質を、注射器などを用いて注入する場合に、刺激物質を押し出す際に生じる圧力の一部を逃がす働きを果たすためである。
- [0059] 図12および図13に示す細胞観察支援器具は、前述した図9から図11に示すものと異なるタイプのものである。すなわち、図12に示す細胞観察支援器具と図13に示す細胞観察支援器具とは、液溜空間の構成と、細胞収容空間110の構成の仕方において相違がある。第1液溜空間113は、開放されていて、液体の注入、細胞の注入、刺激物質の注入等に用いられる。一方、第2液溜空間114は、開放されていない。また、細胞収容空間110を構成する部材119として、シリコンではなく、ステンレスチールを用いている。このようにすることによって、細胞観察支援器具の生産を単純化して、製造原価を低下する効果がある。
- [0060] 図12は、横置き型、すなわち、水平に置くタイプの例である。一方、図13に示す例

は、縦置き型である。図13に示す例では、粘着性のある細胞の場合、ガラス基盤117に付着してしまうため、細胞が落下することはない。

[0061] 図12ないし図13に示したタイプでは、細胞をソース領域111に注入した後に、重力や遠心力などを用いて細胞を細胞収納空間110へ導入することができる。

[0062] ここで、濃度勾配の形成方法について、説明する。

[0063] 前述した図11に示す細胞観察支援器具の場合には、細胞収容空間(チャンネル)110と、第1液溜空間113と、第2液溜空間114とによって構成される空間に、適当な液体を満たす。また、第1液溜空間113および第2液溜空間114のいずれかの管中に、濃度勾配を形成させる目的の物質を含む溶液を注入する。これにより、ソース領域111からドレイン領域112に向かって物質が細胞収容空間110中に拡散する。なお、上部の連通部118間にも、液体120を満たすことによって、振動や傾きなどの影響で細胞収容空間110内を液体が激しく移動することによる濃度勾配の乱れを大幅に軽減することができる。これによって安定的な濃度勾配を維持することが可能となる。

[0064] 図9および図10に示すように、第1液溜空間113aに分岐路として第3液溜空間113bを設け、また、第2液溜空間114aに分岐路として第4液溜空間114bを設けた細胞観察支援器具を用いることもできる。これらの場合には、それぞれ、第1液溜空間113aまたは第2液溜空間114aから、目的の刺激物質130を含む液体が投入される。なお、第1液溜空間113a側から刺激物質130の液体を注入した場合、ソース領域111から細胞収容空間110を経てドレイン領域に向けて刺激物質が拡散する。一方、第2液溜空間114a側から刺激物質の液体を投入した場合、図に示すドレイン領域112が、実質的にソース領域となり、反対側のソース領域111が実質的にドレイン領域となる。従って、ソース領域とドレイン領域とは、図9、図10および図11に示す細胞観察支援器具の場合には、便宜上の名称である。

[0065] なお、図12および図13に示す細胞観察支援器具を用いて濃度勾配を形成することもできる。この場合には、開放されている第1液溜空間113から刺激物質130を含む液体を投入して、ソース領域111から細胞収容空間110を経てドレインに向けて、刺激物質130の濃度勾配を形成される。



- [0066] 図21に、本発明の細胞観察支援器具を用いて観察を行う際に用いる細胞計測システムの構成の一例を示す。図2に示す細胞計測システムは、細胞収容空間110に収容されている細胞の撮像を行うための撮像装置と、撮像された画像について処理し、目的とする情報を得るための画像処理を行う情報処理装置とを備える。
- [0067] 撮像装置は、本実施形態では、顕微鏡310、CCDカメラ320、ステージ316、ステージ駆動装置315、および、情報処理装置350により構成される。一方、情報処理装置は、入力装置330および表示装置340と、コンピュータ350とを有する。
- [0068] コンピュータ350は、中央演算ユニット(CPU)351と、メモリ352と、補助記憶装置353とを有する。補助記憶装置353には、当該CPU351の動作プログラム360と、データ370とが格納される。プログラム360としては、図示していないOSの他、細胞計測システムにおける計測動作を制御する撮像シーケンス361と、ステージを制御するステージ制御352と、撮像を制御する撮像制御363と、得られた画像データの解析を行うデータ解析364とが含まれる。これらのプログラムは、記憶媒体、ネットワークなどから補助記憶装置353にインストールされたものである。データとしては、画像データ371が代表的なものである。
- [0069] 細胞についての撮像は、前述した細胞観察支援器具により観察用細胞群を用意しておき、コンピュータ350の制御により、測定を行う。測定は、予め定めた撮像シーケンス361に従って行う。すなわち、コンピュータ350は、ステージ制御プログラム362により、ステージ駆動装置315を駆動制御して、細胞観察支援器具の複数箇所、例えば、12箇所を、1分おき等の一定のタイミングで、撮像するように位置決めを行う。撮像シーケンス361は、XYステージ316による位置決めと共に、撮像制御プログラム363により、一定タイミングで、細胞収容空間110における細胞群の撮像を行うようCCDカメラ320に指示する。そして、予め定めたタイミングで、CCDカメラ320が撮像した画像をメモリ352に取り込む。
- [0070] 取り込んだ画像データについて、データ解析プログラム64により解析処理を行う。まず、撮像データを、撮像条件と共に、補助記憶装置353に格納する。
- [0071] この後、得られた画像について、指定された処理を行う。この際、予めストップの画像を除去する処理を行うことができる。

[0072] 以下実施例に基づいて、さらに説明する。

(実施例1)

図6に示すストップ配置パターンを有する、図9に示す細胞観察支援器具を用いて細胞の捕捉を行った。細胞観察支援器具100は、第2面部材117としてガラス基盤を用い、第1面部材115およびストップとしてシリコンウェハを用いて構成されている。

[0073] 細胞観察支援器具の空間に、細胞に影響を与えない液体を注入しておく。次に、細胞を、ソース領域111に導入し、ドレイン領域112側から注射器により吸引する。用いた細胞はラット腹腔より採取したマスト細胞である。この状況で、顕微鏡で第2面部材を介して観察し、撮像した。

[0074] 図14(a)に示す写真は、細胞投入前の状態である。図14(b)は、細胞を投入した後の状態である。確かに細胞がストップに保持されることが確認された。

(実施例2～5)

ストップの構造が異なる他は、実施例1と同様にして、細胞の捕捉を調べた。その結果、それぞれ、図15(a)、図16(a)、図17(a)、図18(a)に示すように、細胞等入前の状態から、図15(b)、図16(b)、図17(b)、図18(b)に示すように、それぞれのストップに細胞が捕捉されていることが分かる。

(実施例3)

ストップとして、図5(a)に示すものを用いると共に、細胞をサイズの小さい細胞を先に導入した後、サイズの大きい細胞を導入した場合における細胞捕捉について調べた。図19(a)および図19(b)に結果を示す。図19(a)に示すように、導入前には何も捕捉されていない状態から、図19(b)に示すように、大小2種類の細胞が捕捉されていることが確認された。

[0075] 以上述べたように、本発明によれば、細胞を容易に平面上に設けたストップの位置に配置することができる。その結果、次のことが期待できる。

[0076] 配置した細胞の様子を直接観察することができる。

[0077] 配置した細胞の存在する環境に対して、化合物を導入することができる。

[0078] 配置した細胞の存在する環境に対して、化合物の濃度勾配を形成することができる。

。

[0079] 複数の細胞間における、接触による相互作用を容易に観察することができる。

## 請求の範囲

- [1] 対向する第1の面部材および第2の面部材と、  
前記第1の面部材および第2の面部材間に位置し、細胞の移動を阻止するストップと、を有し、  
前記第1の面部材と第2の面部材とは、それらの対向する面の間に、複数個の細胞を移動可能に収容する細胞収容空間を構成し、  
前記第1の面部材および第2の面部材のうち少なくとも一方は、外部から前記細胞収容空間内を光学的に観察できる部材であり、  
前記ストップは、前記細胞収容空間内に1個以上、配置されることを特徴とする細胞観察支援器具。
- [2] 請求項1に記載の細胞観察支援器具において、  
前記ストップは、少なくとも1個の細胞の通過を阻止する大きさの液体通過部を有し、  
前記柱構造体には、細胞を通過させないが、液体を通過させる液体通過部を有すること  
を特徴とする細胞観察支援器具。
- [3] 請求項2に記載の細胞観察支援器具において、  
前記柱構造体は、細胞の流れの上流側に向かって凹となる湾曲部を有することを特徴とする細胞観察支援器具。
- [4] 請求項2および3のいずれか一項に記載の細胞観察支援器具において、  
前記ストップは、その高さが、前記第1の面部材と第2の面部材との間隔と等しいことを特徴とする細胞観察支援器具。
- [5] 請求項4に記載の細胞観察支援器具において、  
前記ストップは、その高さが、多少とする細胞の直径相当であることを特徴とする細胞観察支援器具。
- [6] 請求項1から5のいずれか一項に記載の細胞観察支援器具において、  
前記ストップは、複数個が行方向に少なくとも1行、配置されることを特徴とする細胞観察支援器具。

- [7] 請求項6に記載の細胞観察支援器具において、  
前記ストップは、複数個のストップを複数行、千鳥配置に配置することを特徴とする細胞観察支援器具。
- [8] 対向する第1の面部材および第2の面部材により構成される細胞収容空間に液体を満たし、該液体中に細胞を導入し、第1の面部材および第2の面部材のうち透明な部材を通して細胞を光学的に観察する細胞観察方法において、  
前記第1の面部材および第2の面部材間に、細胞の移動を阻止するストップを1個以上配置し、  
細胞収容空間内に複数個の細胞を導入し、前記いずれかのストップにより移動が阻止された細胞を観察対象とすること  
を特徴とする細胞観察方法。

[図1]

図1 (a)

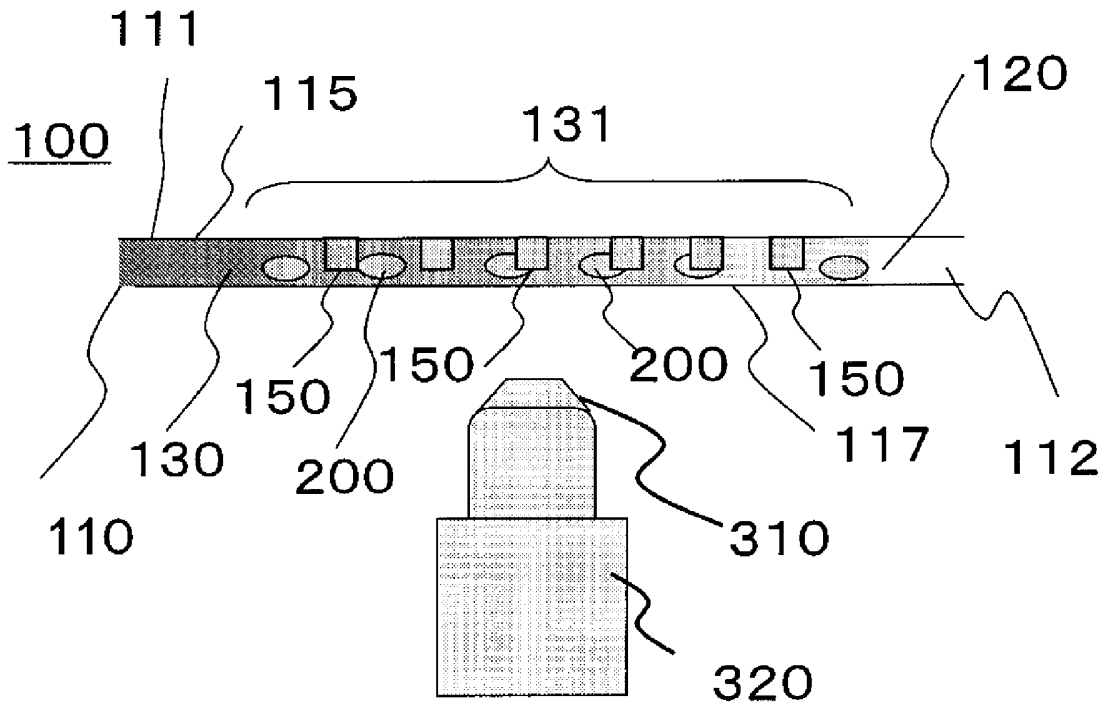
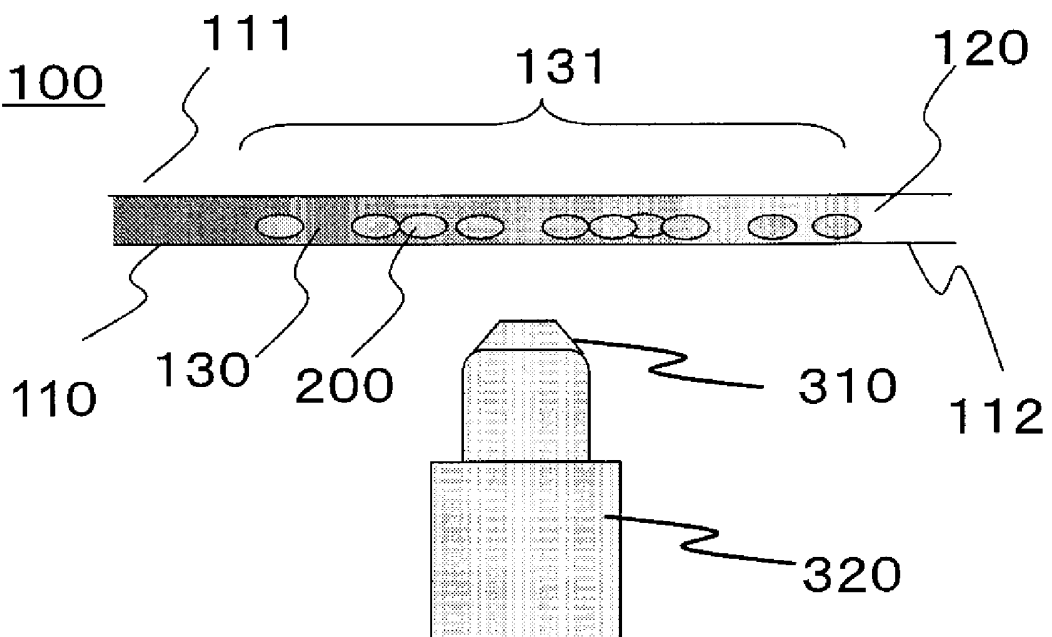


図1 (b)



[図2]

図2(a)

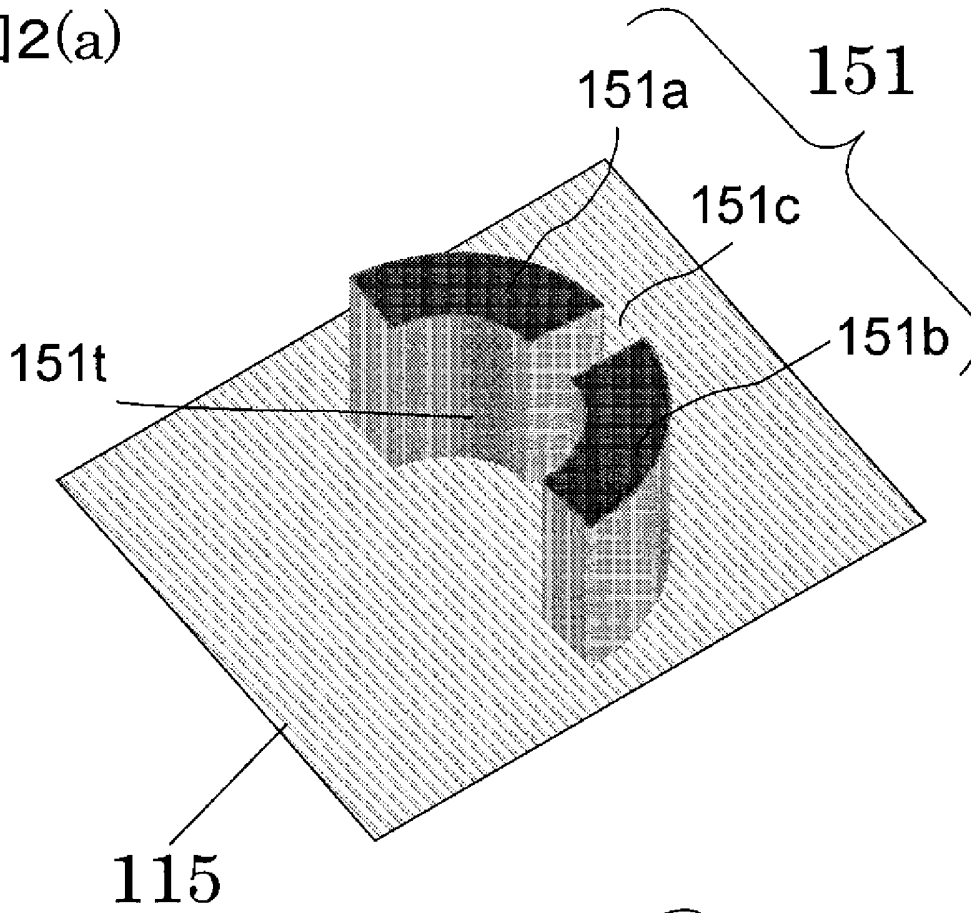
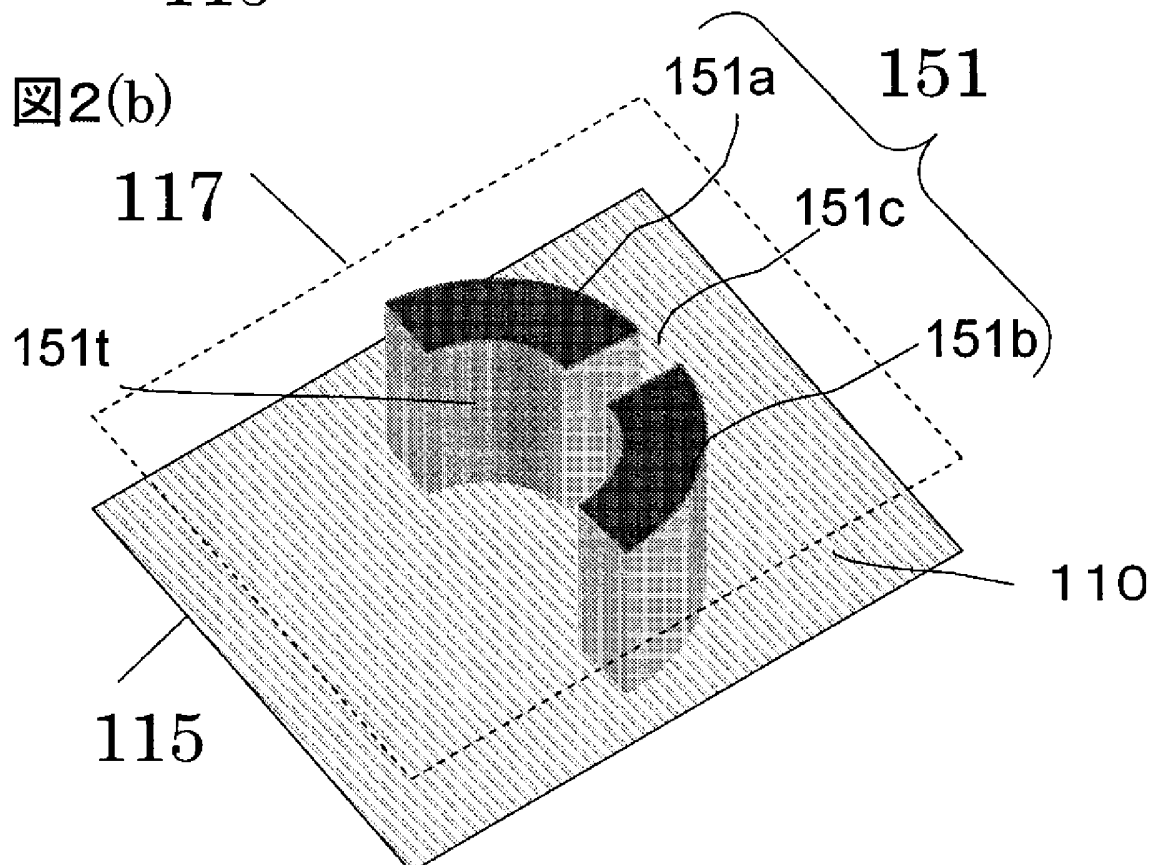


図2(b)



[図3]

図3(a)

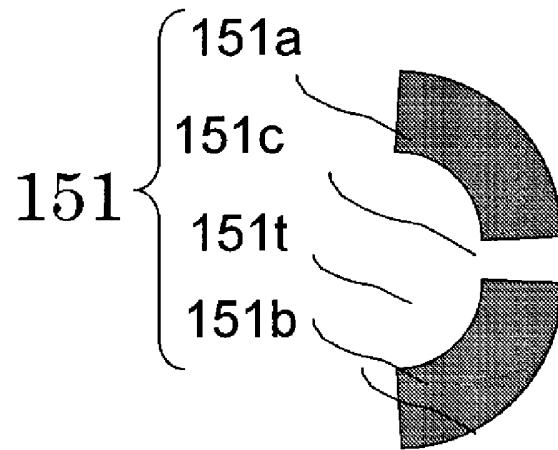
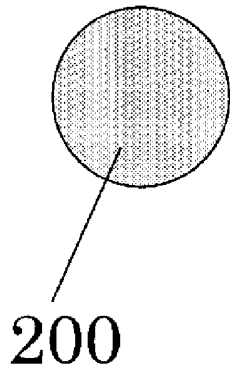


図3(b)

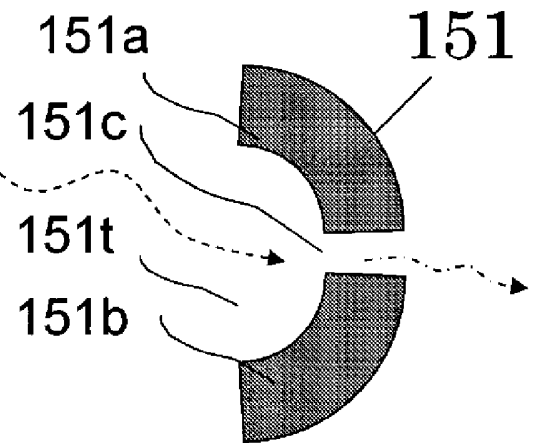
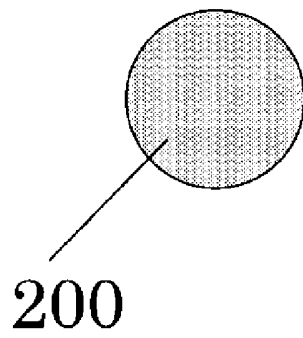
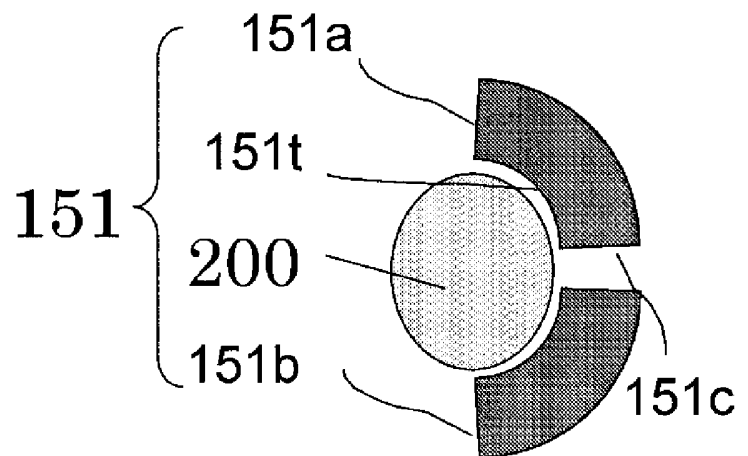
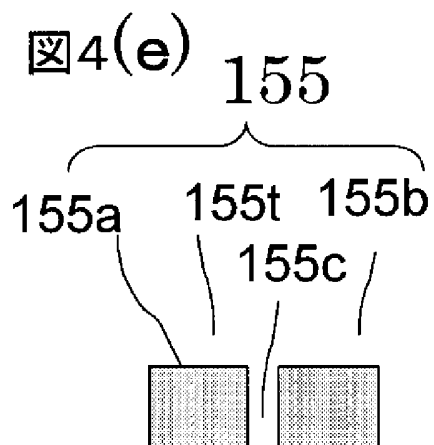
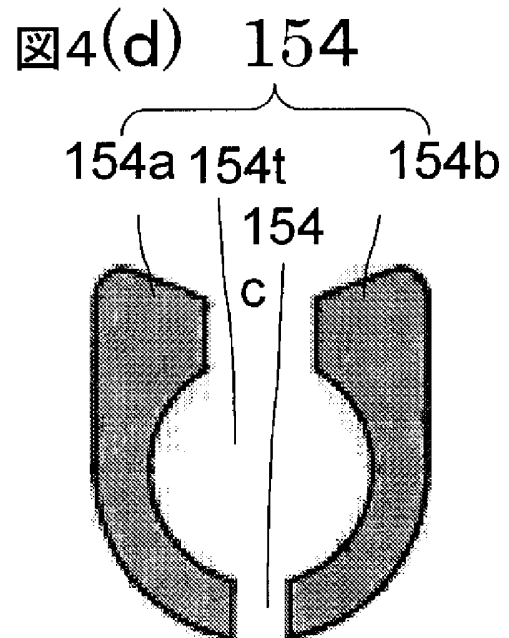
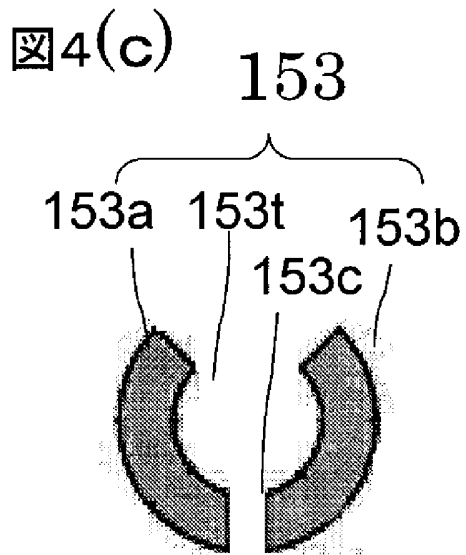
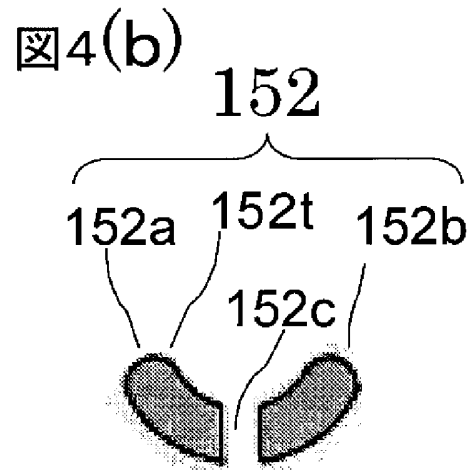
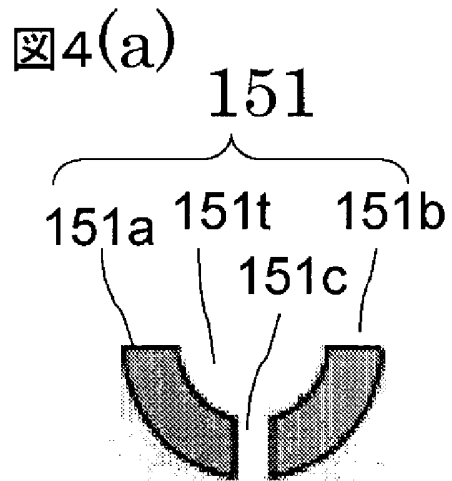


図3(c)





[図4]



[図5]

図5(a)

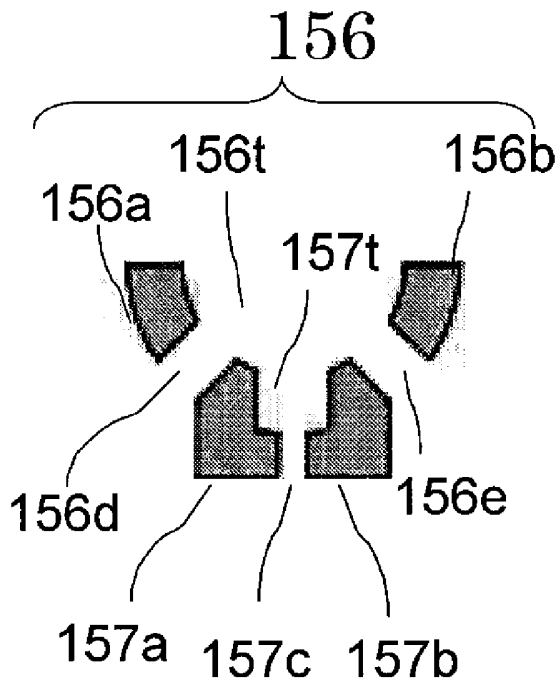
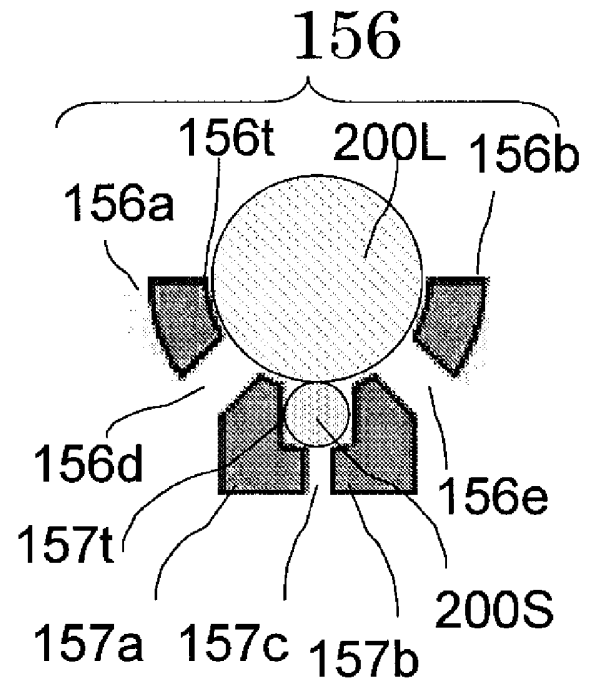
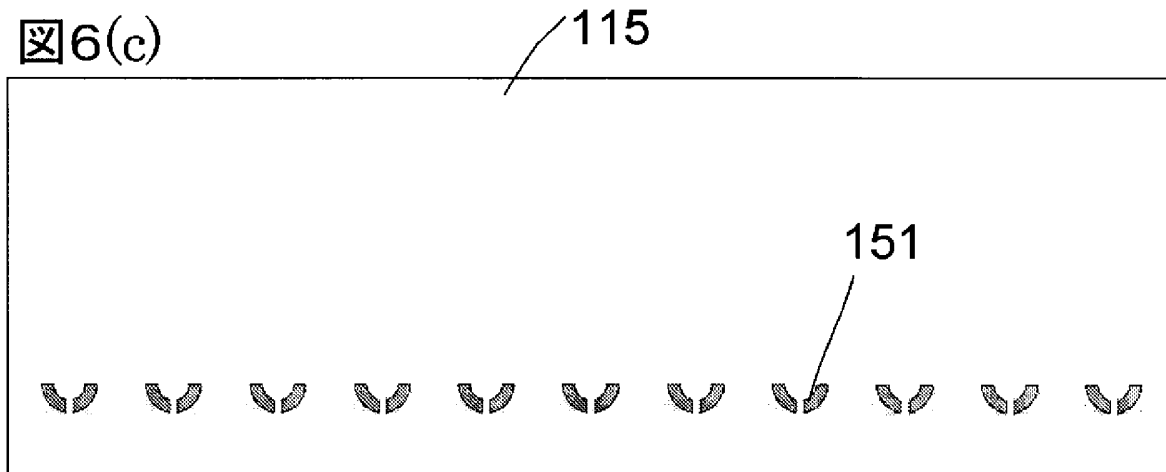
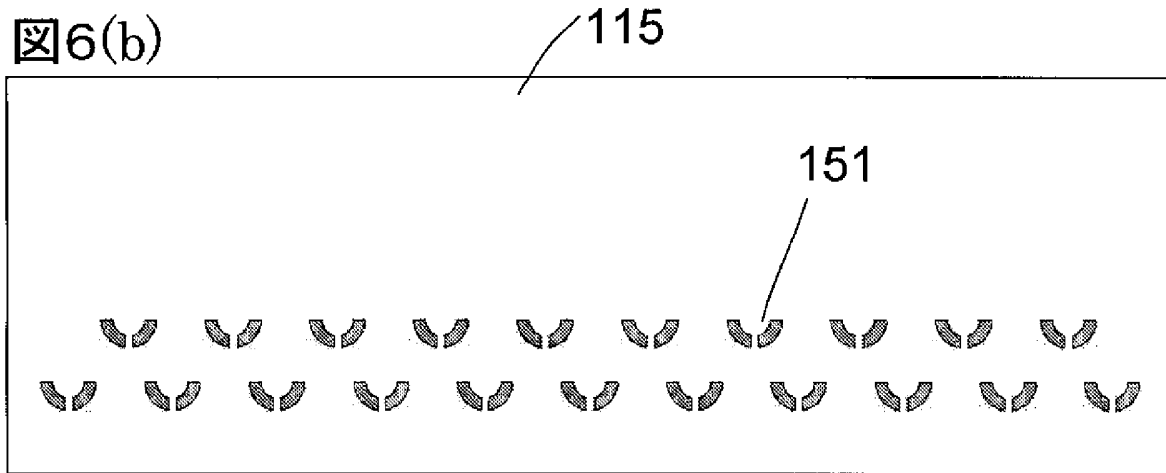
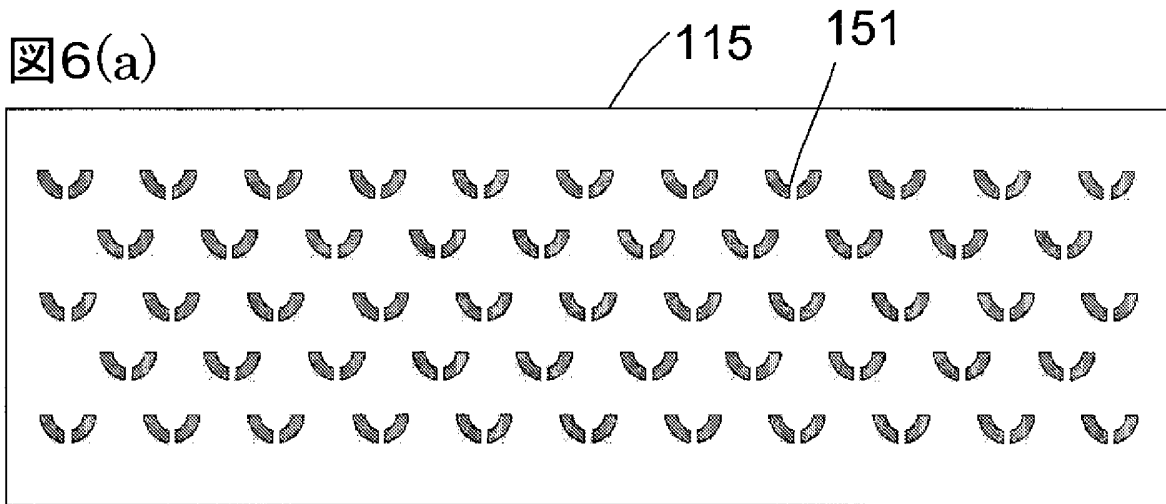


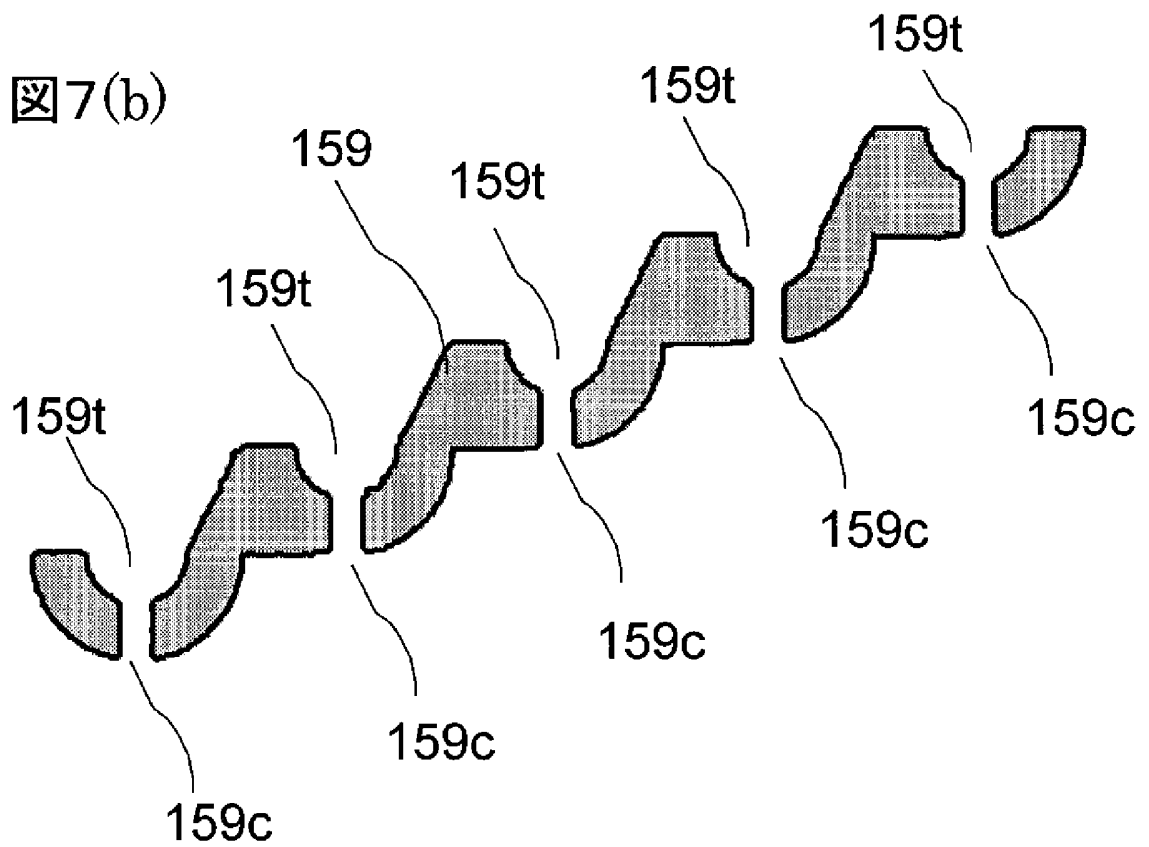
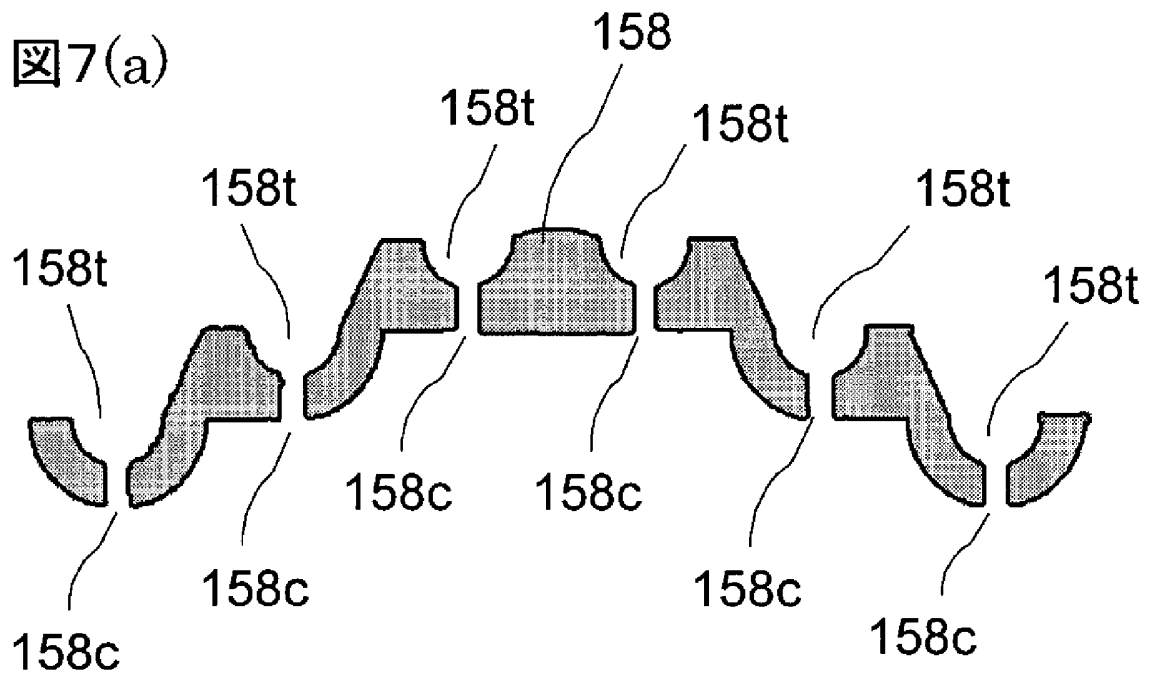
図5(b)



[図6]



[図7]



[図8]

図8(a)

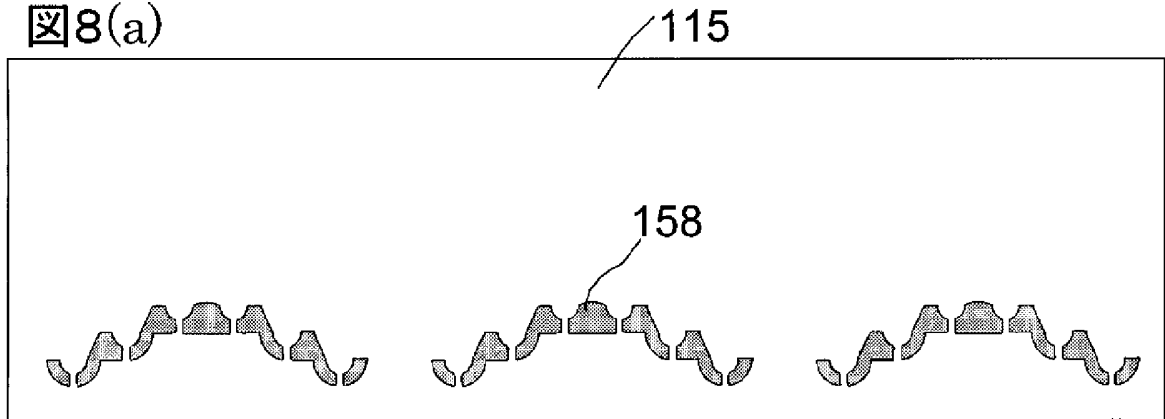


図8(b)

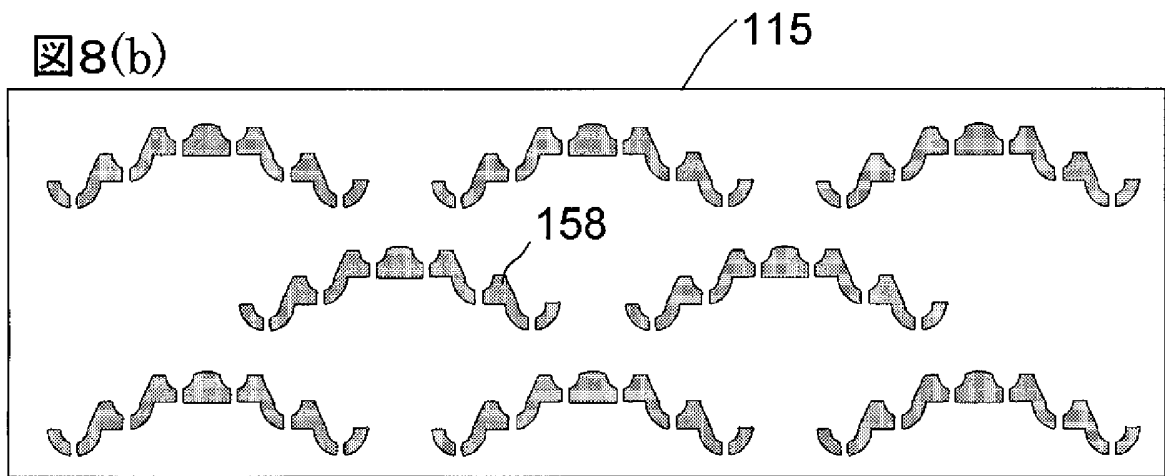
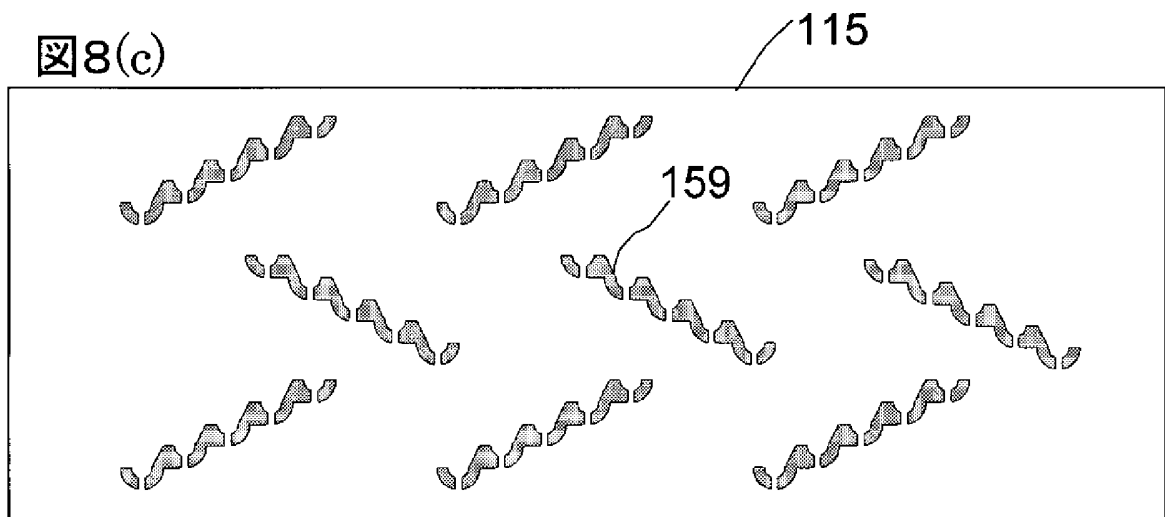
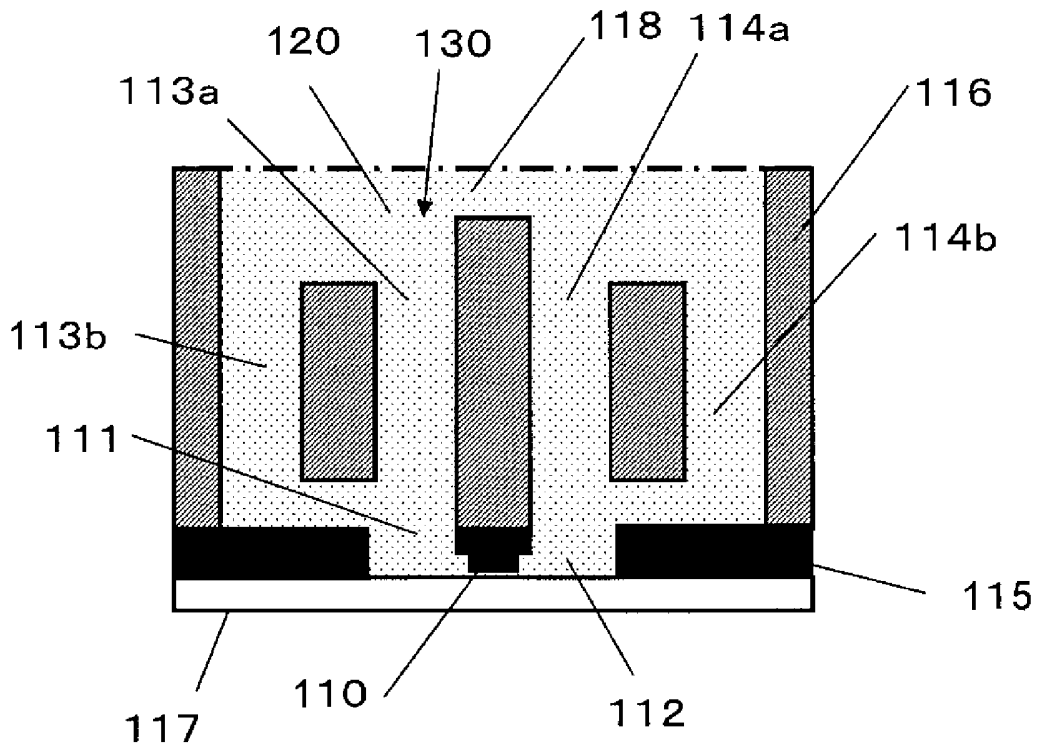


図8(c)



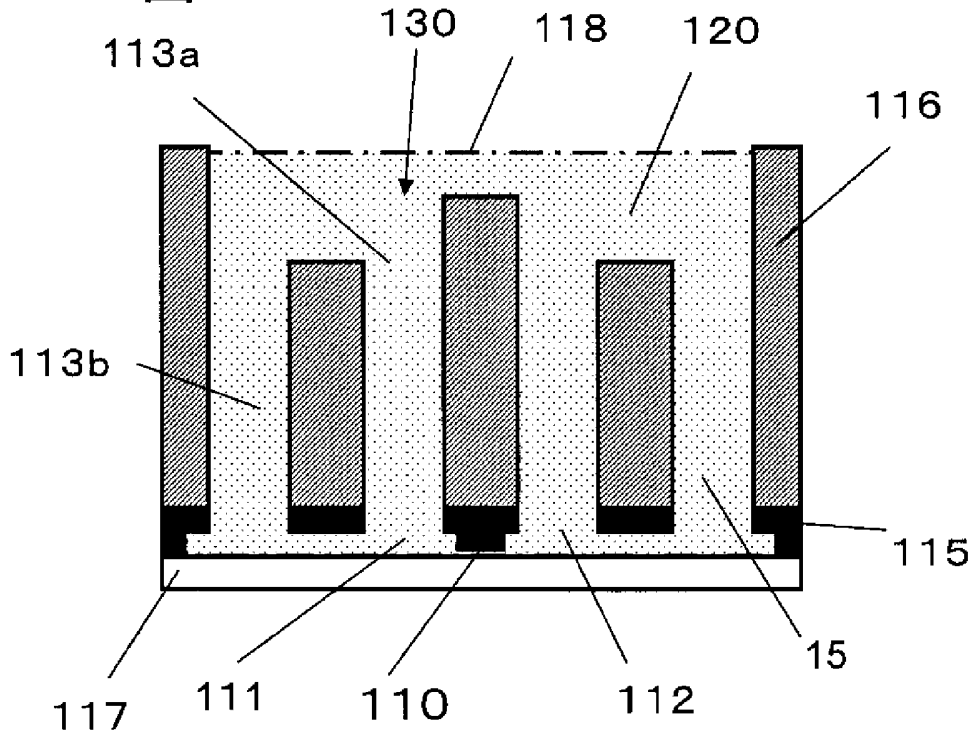
[図9]

図9

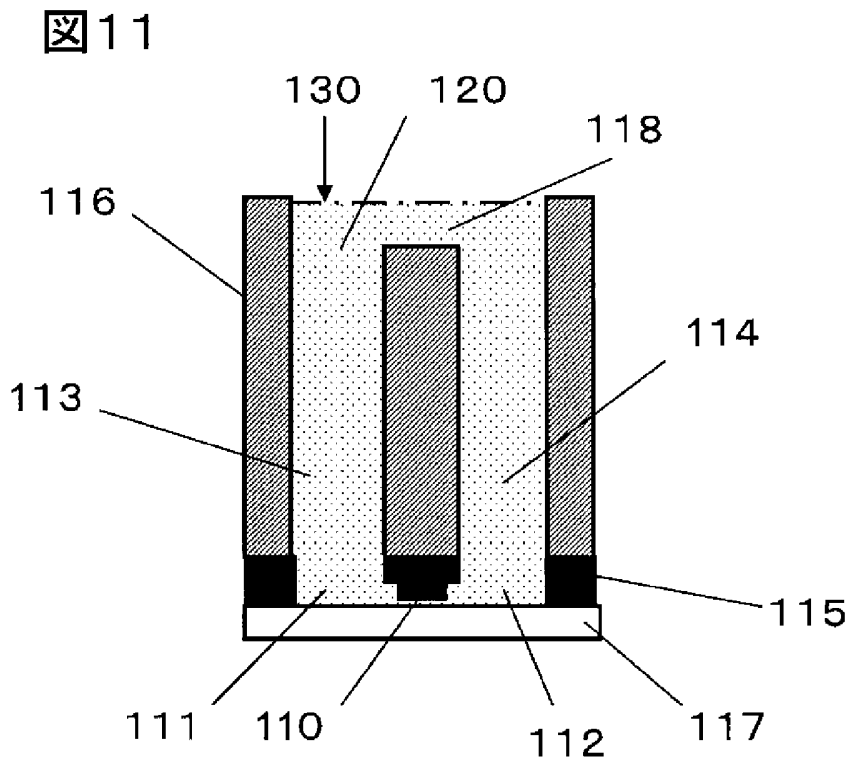


[図10]

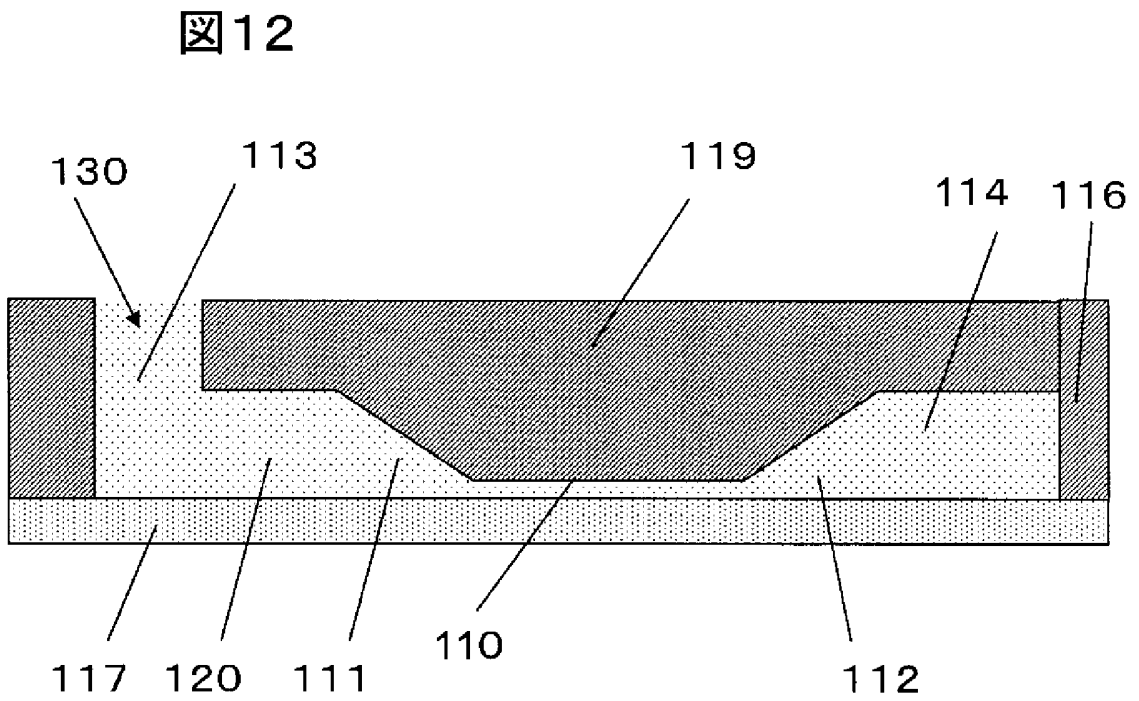
図10



[図11]

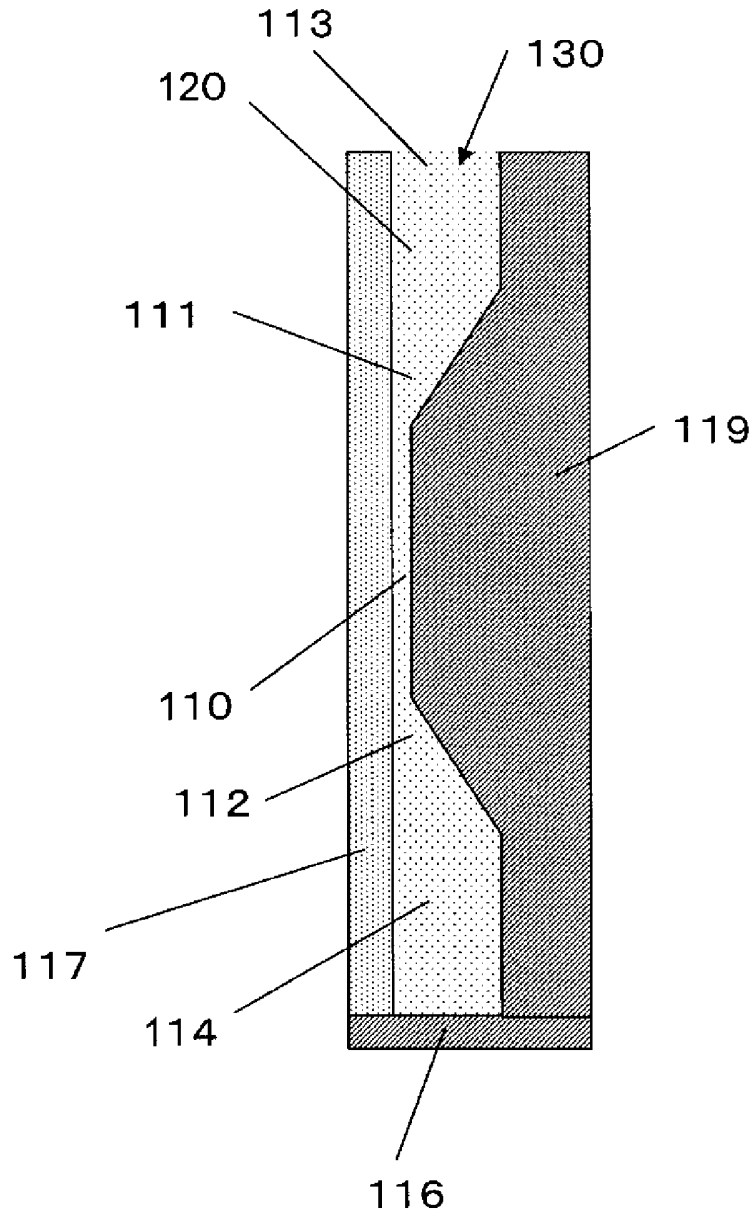


[図12]



[図13]

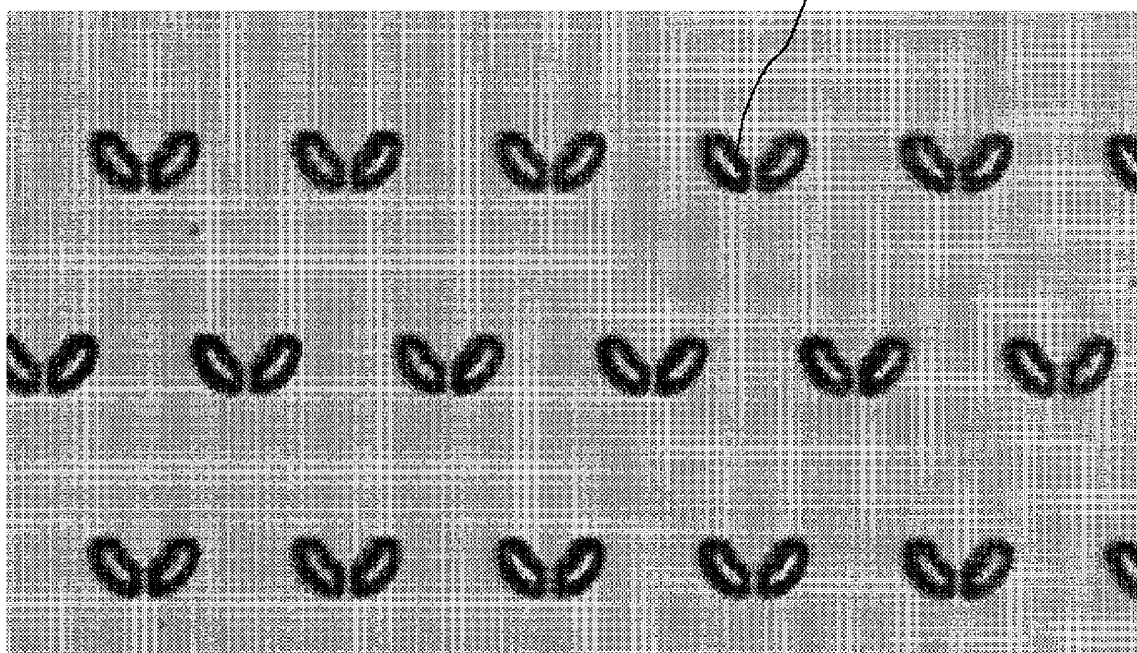
図13





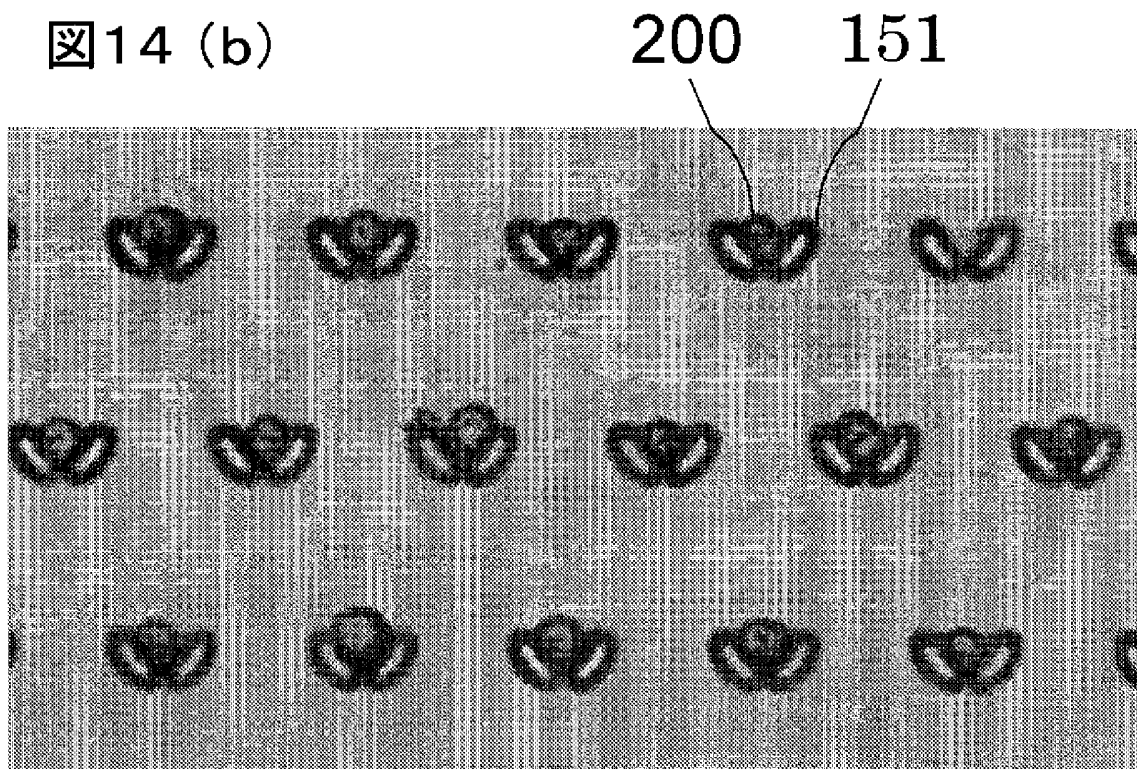
[図14]

図14 (a)



細胞投入前

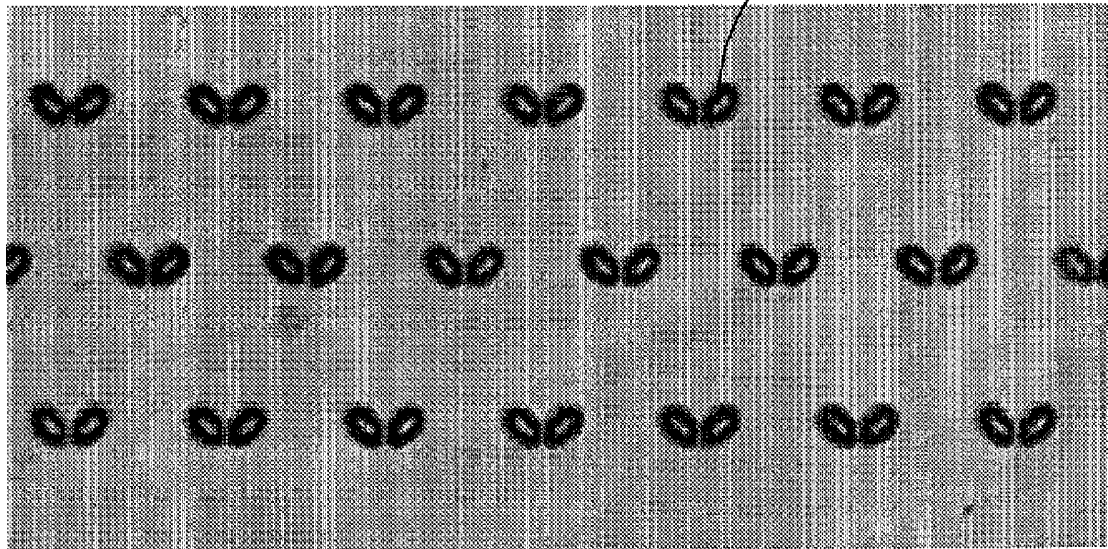
図14 (b)



細胞投入後

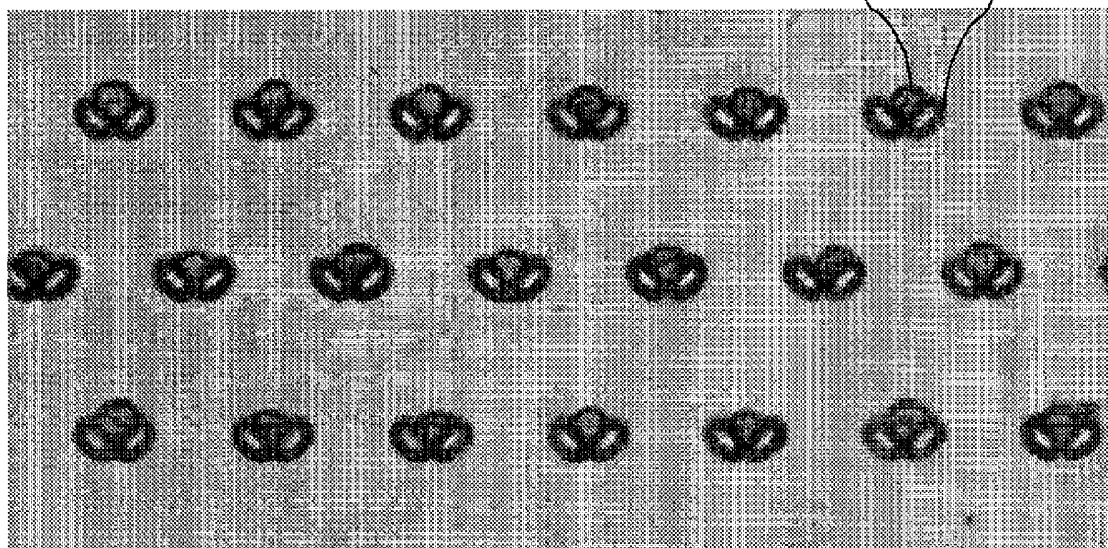
[図15]

図15 (a)



細胞投入前

図15 (b)

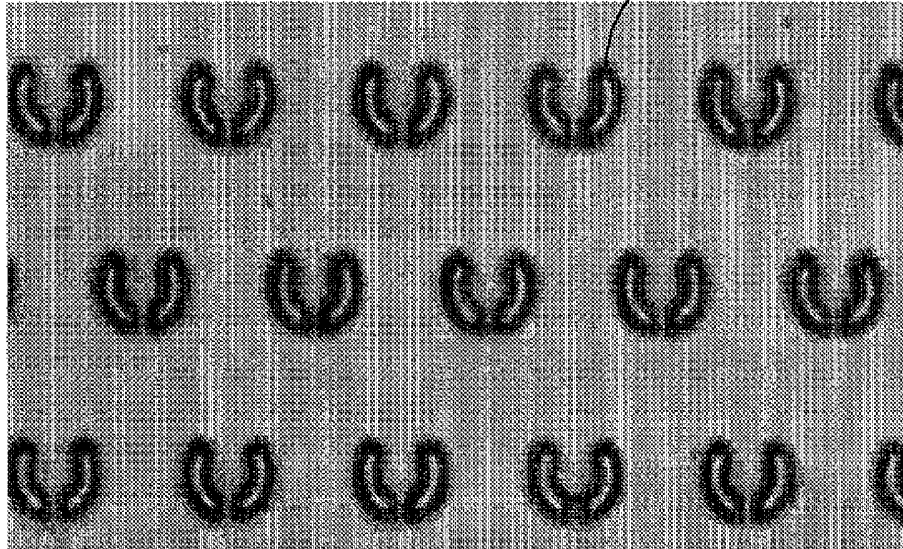


細胞投入後

[図16]

図16 (a)

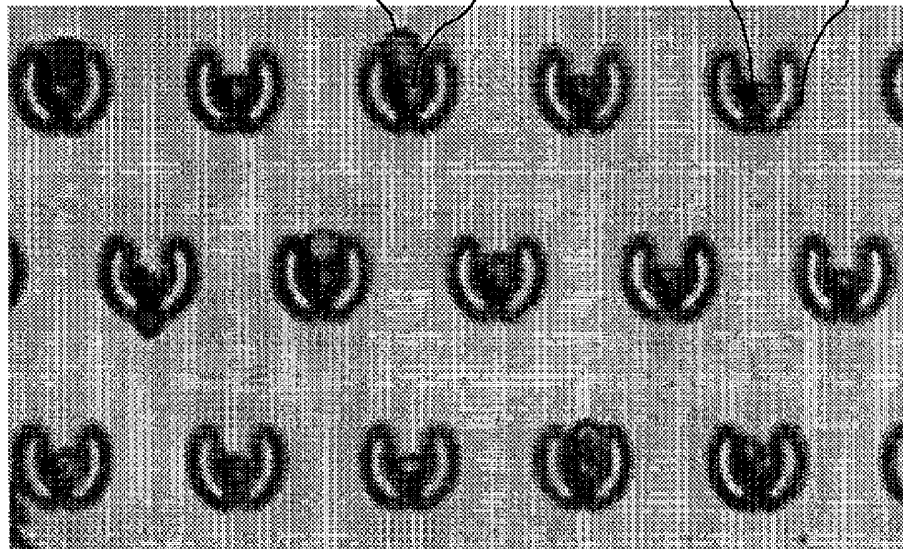
153



細胞投入前

図16 (b)

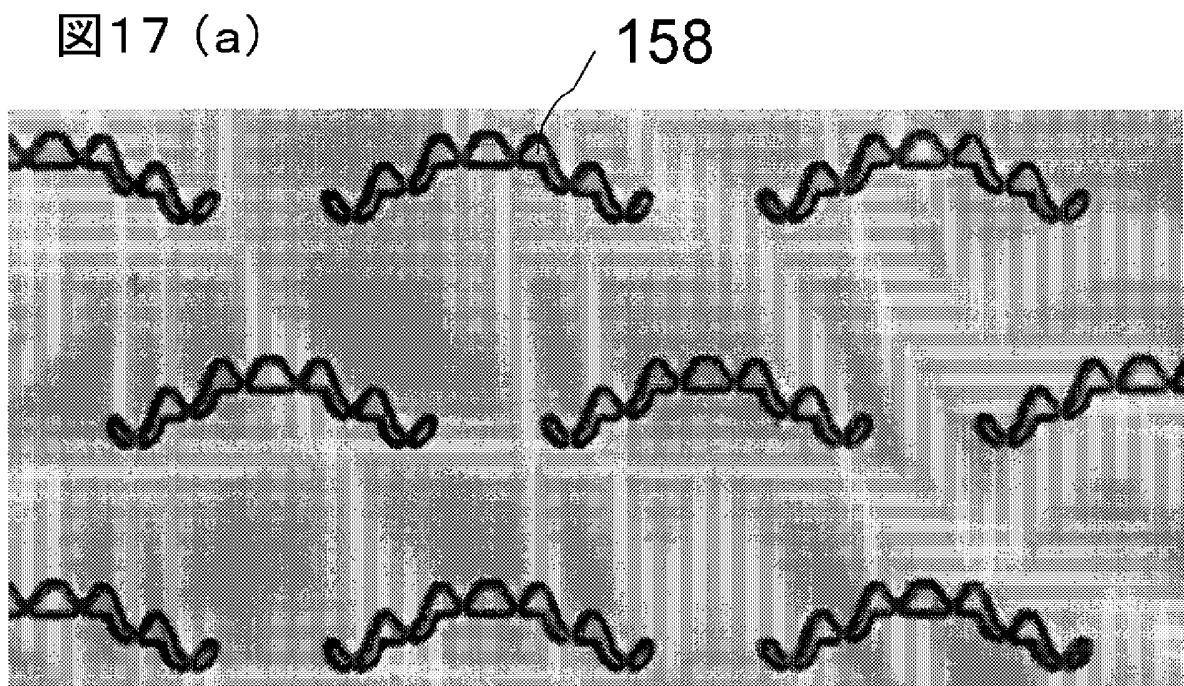
200 200 200 153



細胞投入後

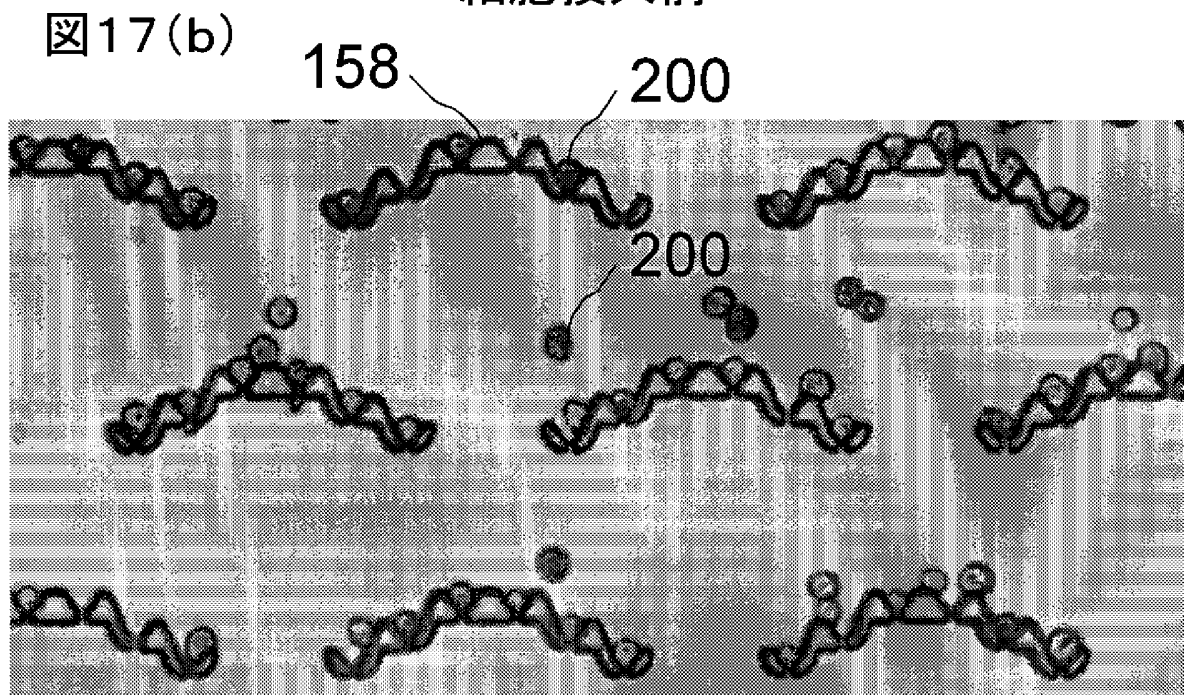
[図17]

図17(a)



細胞投入前

図17(b)

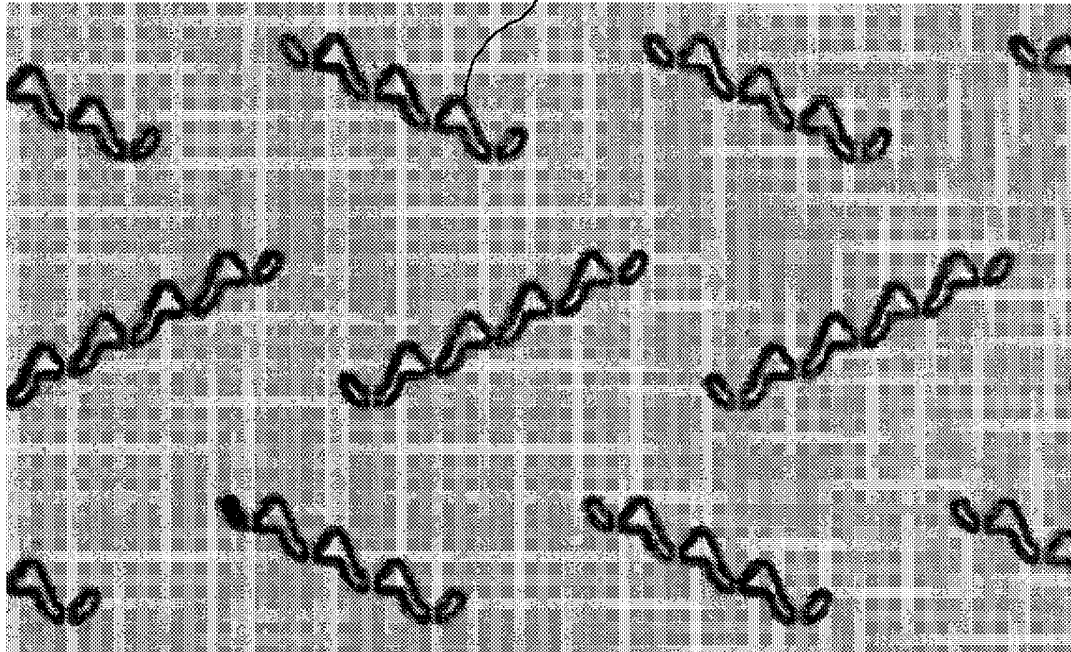


細胞投入後

[図18]

図18 (a)

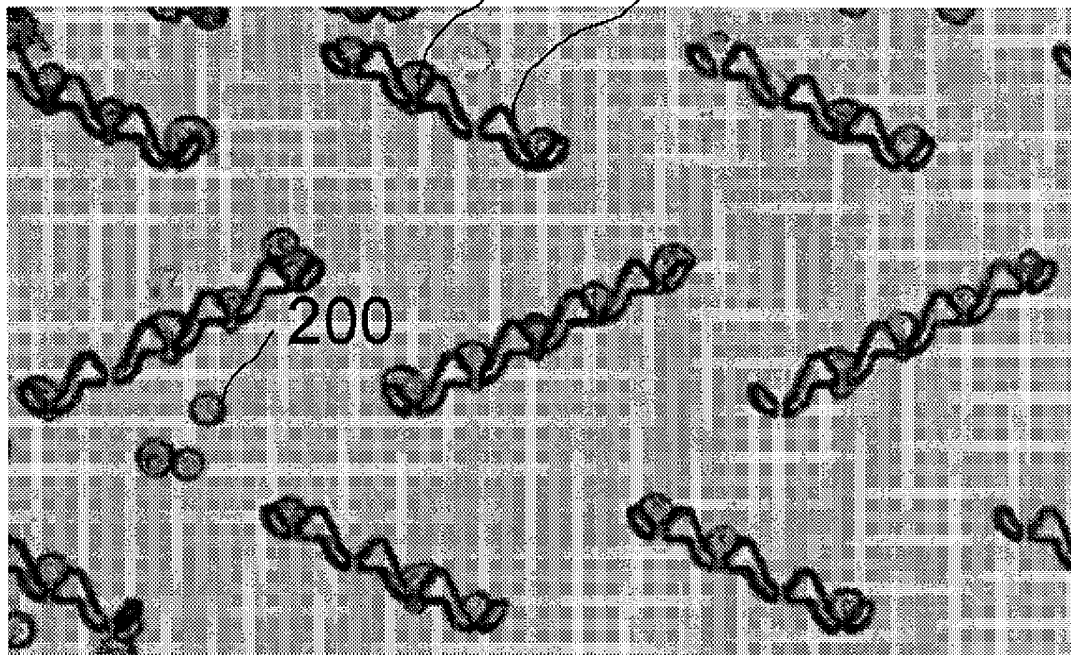
159



細胞投入前

図18 (b)

200 159



細胞投入後

[図19]

図19(a)

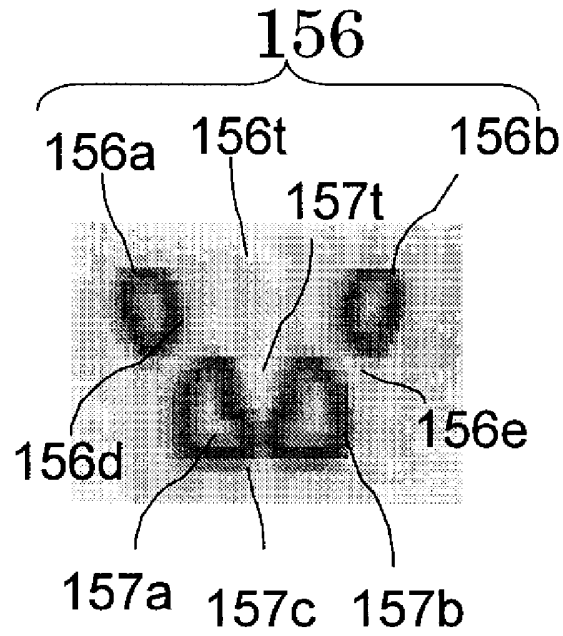
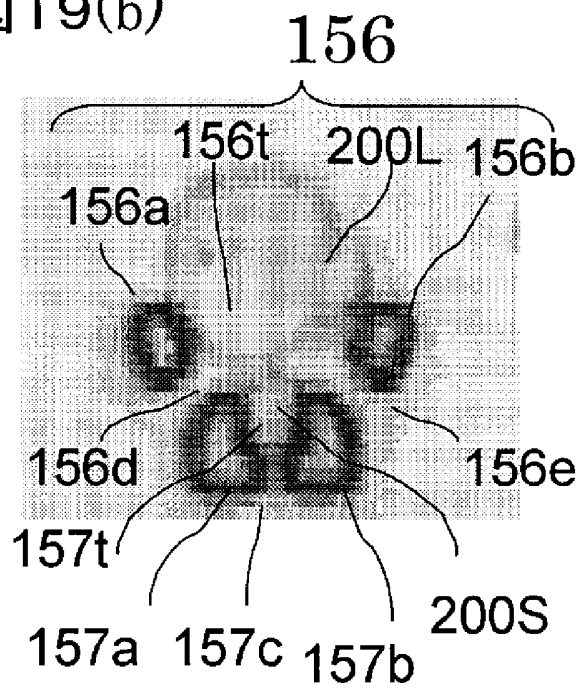
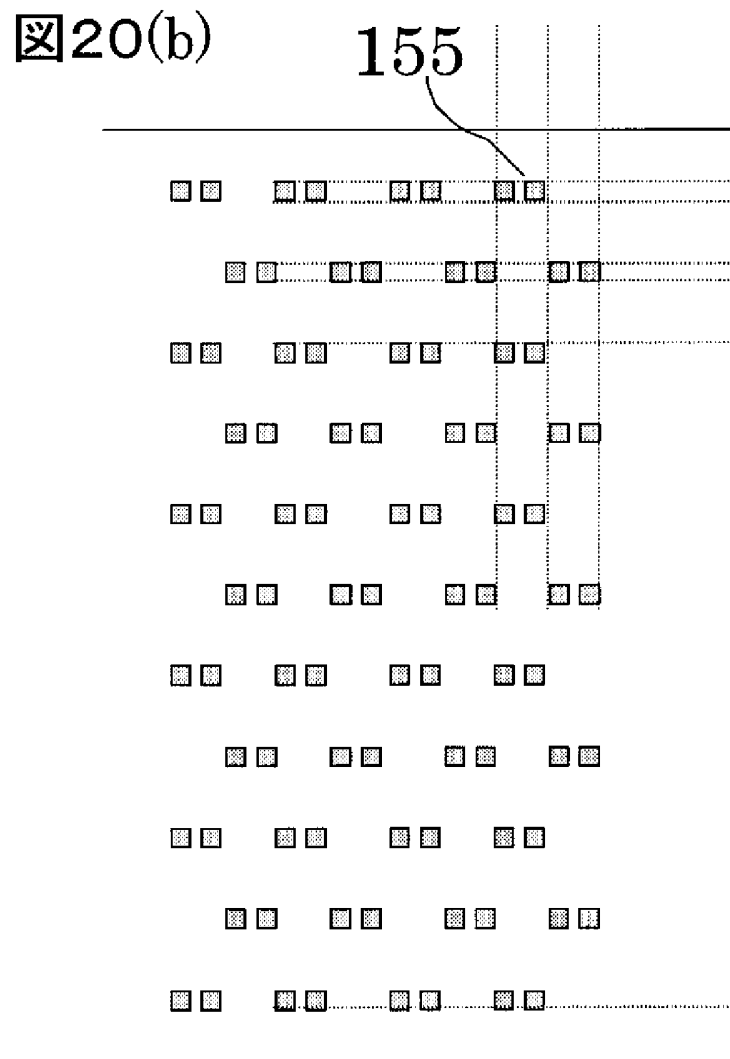
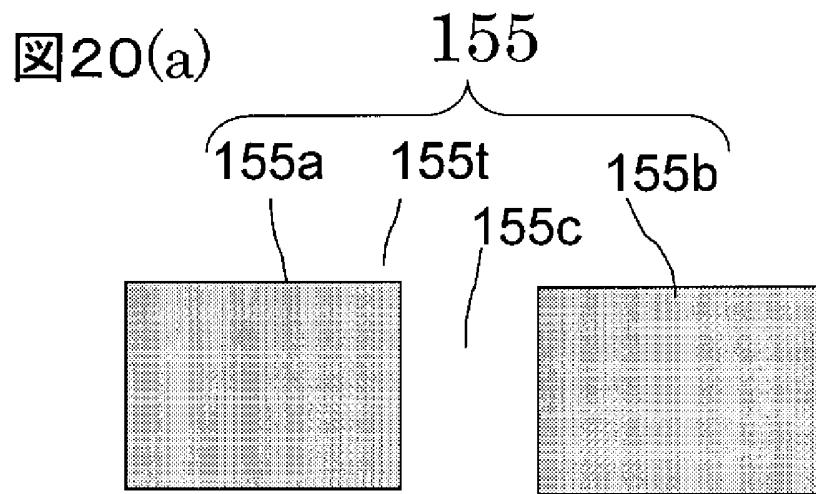


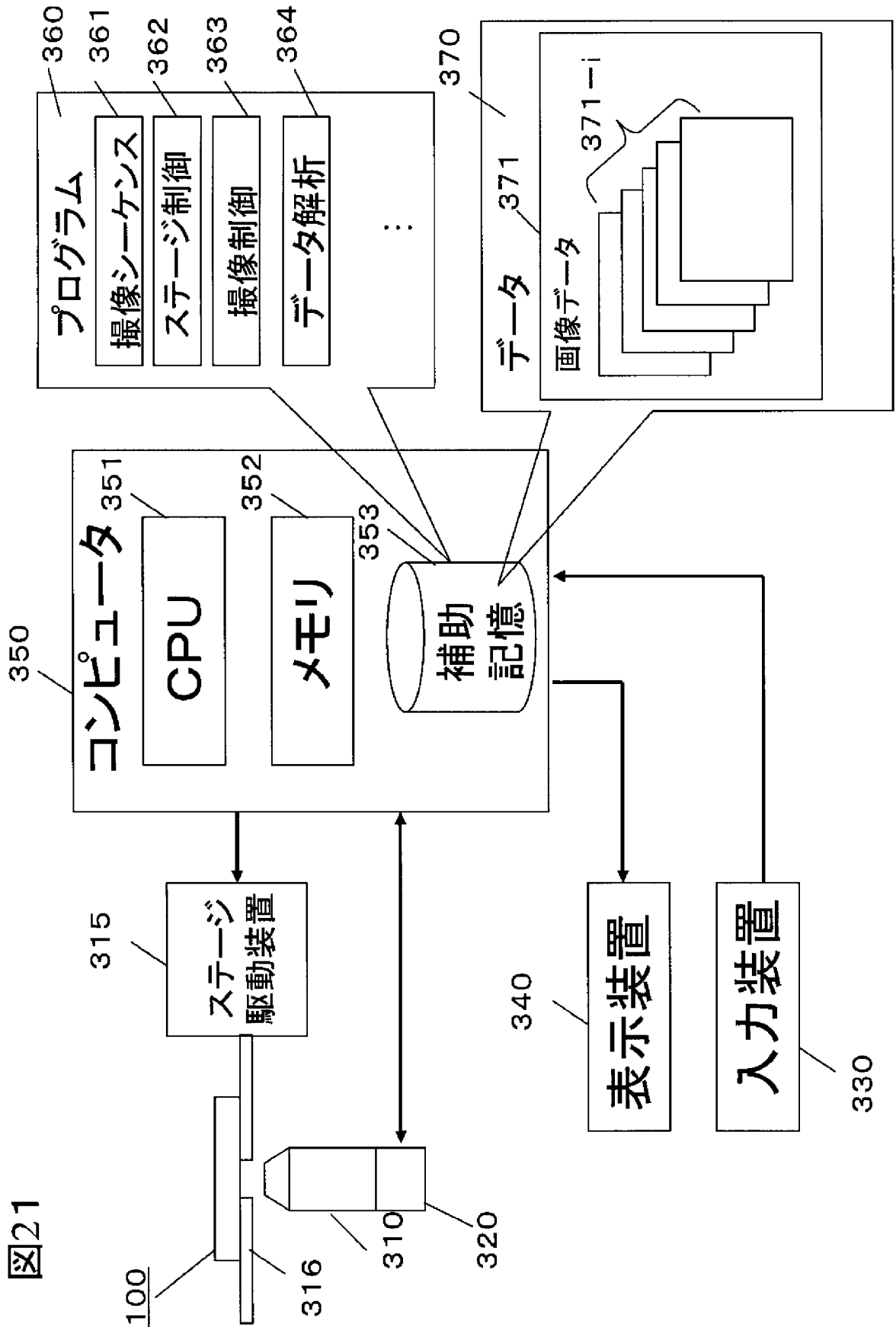
図19(b)



[図20]



[図21]





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/305403

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**C12M1/34** (2006.01), **C12Q1/02** (2006.01)

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** (2006.01), **C12Q1/02** (2006.01)

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

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.
<u>X</u> A	JP 2003-533221 A (The Board of Trustees of the University of Illinois), 11 November, 2003 (11.11.03), Full text & WO 01/88087 A3	<u>1-2, 5, 8</u> 3-4, 6-7
A	JP 2004-012215 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 15 January, 2004 (15.01.04), Full text (Family: none)	1-8
A	JP 2004-271331 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 30 September, 2004 (30.09.04), Full text (Family: none)	1-8

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 14 June, 2006 (14.06.06)	Date of mailing of the international search report 27 June, 2006 (27.06.06)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

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), C12Q1/02(2006.01)		
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(2006.01), C12Q1/02(2006.01)		
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		
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 請求の範囲の番号
X A	JP 2003-533221 A (ザ、ボード、オブ、トラスティーズ、オブ、ザ、 ユニバシティ、オブ、イリノイ) 2003. 11. 11, 全文 & WO 01/88087 A3	1-2, 5, 8 3-4, 6-7
A	JP 2004-012215 A (松下電器産業株式会社) 2004. 01. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2004-271331 A (松下電器産業株式会社) 2004. 09. 30, 全文 (ファミリーなし)	1-8
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 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 14. 06. 2006	国際調査報告の発送日 27. 06. 2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 松田 芳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3126