

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
【部門区分】 第 1 部門第 1 区分
【発行日】 令和 5 年 10 月 5 日 (2023.10.5)

【国際公開番号】 WO2022/163438
【出願番号】 特願 2022-578267 (P2022-578267)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6897(2018.01)

C 1 2 M 1/34(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6897 Z

C 1 2 M 1/34 B

C 1 2 N 15/09 Z

10

【手続補正書】

【提出日】 令和 5 年 7 月 12 日 (2023.7.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0004

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0004】

本発明の第 1 の態様においては、神経細胞の解析方法を提供する。前記神経細胞の解析方法は、神経細胞を時系列に撮像した時系列画像を取得する画像取得工程を備えてよい。前記神経細胞の解析方法は、前記時系列画像に基づいて、前記神経細胞の神経突起の領域あるいは細胞体の領域を識別する細胞領域識別工程を備えてよい。前記神経細胞の解析方法は、前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第 1 蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、前記細胞領域識別工程で識別された前記神経突起の領域あるいは前記細胞体の領域に凝集した前記特定タンパク質の凝集物の有無を、前記時系列画像に含まれる前記第 1 蛍光タンパク質の輝度を基準にして検出する凝集物検出工程を備えてよい。前記神経細胞の解析方法は、前記凝集物検出工程の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析する解析工程を備えてよい。前記解析工程は、前記複数の群と、前記複数の群の生存状態との関係を、前記群ごとに表示することを含んでよい。

20

30

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0005

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0005】

本発明の第 2 の態様においては、前記時系列画像は、位相差画像のデータ、前記第 1 蛍光タンパク質の輝度を含む蛍光画像のデータ、および動画画像ファイルを含むデータの少なくとも 1 つを有してよい。

40

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0006

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0006】

50

本発明の第3の態様においては、前記細胞領域識別工程は、前記画像取得工程にて前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第1蛍光タンパク質を時系列で撮像してよい。前記細胞領域識別工程は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が第一輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起の領域として識別することを含んでよい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

10

本発明の第4の態様においては、前記細胞領域識別工程は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値を超えた領域の中で、所定のサイズ閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起または細胞体の領域として識別することを含んでよい。前記細胞領域識別工程は、識別された同一の前記神経突起および同一の前記細胞体を、それぞれ時系列に追跡して、前記生存状態に関連する生存時間を算出してよい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

20

本発明の第6の態様においては、前記細胞領域識別工程は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が、前記第一輝度閾値と異なる第二輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の細胞体の領域として識別してよい。前記凝集物検出工程は、前記細胞領域識別工程にて識別された前記細胞体の領域において、前記第1蛍光タンパク質の輝度と第一輝度閾値との比較に基づき前記特定タンパク質の凝集物の有無を検出してよい。前記解析工程は、前記凝集物検出工程における前記神経突起内の凝集物の有無および前記細胞体内の凝集物の有無の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析してよい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

30

本発明の第7の態様においては、前記細胞領域識別工程は、前記神経細胞内で発現する前記第1蛍光タンパク質とは異なる第2蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、さらに、前記神経細胞の細胞体または神経突起の領域を識別してよい。前記凝集物検出工程は、前記第1蛍光タンパク質および前記第2蛍光タンパク質に基づき、識別された前記神経突起内の凝集物が軸索の内部に存在するか、または樹状突起の内部に存在するか否かを検出してよい。前記解析工程は、前記凝集物検出工程の検出結果に基づき、前記神経突起内の凝集物が前記細胞体に近い側に存在する細胞群と、前記神経突起の末端に近い側に存在する細胞群とに分類し、前記細胞群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析してよい。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

40

50

【0013】

本発明の第10の態様においては、前記神経細胞の生存状態は、前記神経細胞の生死、生存時間、および生存率の少なくとも1つを含んでよい。前記解析工程は、前記凝集物検出工程にて検出された神経突起内の凝集物の有無および前記細胞体内の凝集物の有無の検出結果と前記神経細胞の生存状態との関係を表示部に表示することを含んでよい。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0015】

本発明の第12の態様においては、神経細胞の解析装置を提供する。前記神経細胞の解析装置は、神経細胞を時系列に撮像した時系列画像を取得する撮像部（「撮像装置」ということがある）を備えてよい。前記神経細胞の解析装置は、前記時系列画像に基づいて、前記神経細胞の神経突起の領域あるいは細胞体の領域を識別する識別部を備えてよい。前記神経細胞の解析装置は、前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第1蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、前記識別部で識別された前記神経細胞の前記神経突起の領域あるいは前記細胞体の領域に凝集した前記特定タンパク質の凝集物の有無を、前記時系列画像に含まれる前記第1蛍光タンパク質の輝度を基準にして検出する検出部を備えてよい。前記神経細胞の解析装置は、前記検出部の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析する解析部を備えてよい。

20

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明の第13の態様においては、前記神経細胞の生存状態は、少なくとも前記神経細胞の生存時間、および生存率のいずれか1つを含んでよい。前記解析部は、前記複数の群と、前記複数の群の生存状態との関係を、前記群ごとに表示することを含んでよい。

30

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明の第15の態様においては、前記識別部は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値を超えた領域の中で、所定のサイズ閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起または細胞体の領域として識別してよい。前記識別部は、識別された同一の前記神経突起および同一の前記細胞体を、それぞれ時系列に追跡して、前記生存状態に関連する生存時間を算出してよい。

40

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明の第17の態様においては、前記識別部は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値と異なる第二輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の細

50

胞体の領域として識別してよい。前記検出部は、前記識別された前記細胞体の領域において、前記第1蛍光タンパク質の輝度と前記第一輝度閾値との比較に基づき前記特定タンパク質の凝集物の有無を検出してよい。前記解析部は、前記検出部における前記神経突起内の凝集物の有無および前記細胞体内の凝集物の有無の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析してよい。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

10

【0038】

出力部160は、演算装置170の処理結果を出力する。例えば、出力部160は、解析結果である神経細胞の生存率曲線などを出力してよい。例えば、出力部160は、演算装置170に接続されたモニターであってよい。出力部160を、表示部ということがある。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

20

【0053】

まず、S200において、撮像装置10は、神経細胞を撮像して、複数の画像を生成する（S200のステップを、「画像取得工程」ということがある）。S200において、神経細胞を撮像して複数の画像を生成するステップは、図4に示すように、S201からS206のステップを含む。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0063】

また、撮像装置制御部171は、タイムラプス撮像した各ラウンドでの画像を観察方法ごとに時系列で連結した時系列画像を動画ファイルとして生成してよい。例えば、撮像装置制御部171は、複数の位相差画像を時系列で連結した位相差画像の動画ファイルを生成し、および／または、複数の蛍光画像を時系列で連結した蛍光画像の動画ファイルを生成してよい。これに加えて／代えて、撮像装置制御部171は、位相差画像および蛍光画像をフレームごとに合成し、合成後の各フレームを時系列に連結した合成画像の動画ファイルを生成してよい。撮像装置制御部171は、撮像装置10が撮像した時系列の位相差画像（位相差時系列画像）のデータ、時系列の蛍光画像（蛍光時系列画像）のデータ、および／または生成した動画ファイルを含むデータを、出力部160に表示し、および／または記録部190に記録してよい。タイムラプス撮像を終了した後で、撮像装置制御部171は処理をS210、および／またはS250に進める。なお、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、S201からS206のステップの一部を省略してもよい。

40

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

次に、S210において、識別部350は、取得した複数の蛍光時系列画像に基づいて

50

、所定の輝度閾値およびサイズ閾値を超えた領域を細胞体の領域として抽出する。S 2 1 0において、複数の画像に基づいて、所定の輝度閾値およびサイズ閾値を超えた領域を細胞体の領域として抽出するステップは、図 5 Aに示すように、S 2 1 1からS 2 1 5のステップを含む。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 7】

10

上記のS 2 1 1からS 2 3 6のステップを行うことで、検出部 4 0 0は、細胞体の領域、および細胞体内凝集物領域を判断してよい（検出部 4 0 0のこれらの判断を、それぞれ、「細胞領域識別工程」、および「凝集物検出工程」ということがある。）。

【手続補正 1 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 9】

20

S 2 5 0において、識別部 3 5 0は、取得した複数の蛍光時系列画像に基づいて、所定の輝度閾値およびサイズ閾値を超えた領域を神経突起の領域として抽出する。S 2 5 0において、複数の画像に基づいて、輝度閾値およびサイズ閾値を超えた領域を神経突起の領域として抽出するステップは、図 7 Aに示すように、S 2 5 1からS 2 5 5のステップを含む。なお、「抽出」のことを、「識別」という場合がある。

【手続補正 1 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 0】

30

次に、S 3 1 0において、解析部 6 0 0は、対応付け部 5 5 0から細胞体IDと神経突起IDとの対応付けを取得し、対応付けがされた神経細胞の生存時間を解析する。例えば、解析部 6 0 0は、神経突起内凝集物を有する神経細胞と、神経突起内凝集物を有さない神経細胞とで、生死の割合および／または生存時間をそれぞれ解析して算出してよい。ここで、細胞の生死については、神経突起または細胞体の輝度が、輝度閾値未満の場合に、前記神経細胞が死であると定義してよい。なお、このS 3 1 0のステップを、「解析工程」ということがある。

【手続補正 1 9】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

40

神経細胞を時系列に撮像した時系列画像を取得する画像取得工程と、前記時系列画像に基づいて、前記神経細胞の神経突起の領域あるいは細胞体の領域を識別する細胞領域識別工程と、

前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第1蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、前記細胞領域識別工程で識別された前記神経突起の領域あるいは前記細胞体の領域に凝集した前記特定タンパク質の凝集物の有無を、前

50

記時系列画像に含まれる前記第1蛍光タンパク質の輝度を基準にして検出する凝集物検出工程と、

前記凝集物検出工程の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析する解析工程と、

を備え、

前記神経細胞の生存状態は、少なくとも前記神経細胞の生存時間、および生存率のいずれか一つを含み、

前記解析工程は、前記複数の群と、前記複数の群の生存状態との関係を、前記群ごとに表示することを含む、

神経細胞の解析方法。

10

【請求項2】

前記時系列画像は、位相差画像のデータ、前記第1蛍光タンパク質の輝度を含む蛍光画像のデータ、および動画ファイルを含むデータの少なくとも1つを有する、

請求項1に記載の神経細胞の解析方法。

【請求項3】

前記細胞領域識別工程は、

前記画像取得工程にて前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第1蛍光タンパク質を時系列で撮像し、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が第一輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起の領域として識別することを含む、

請求項2に記載の神経細胞の解析方法。

20

【請求項4】

前記細胞領域識別工程は、

前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値を超えた領域の中で、所定のサイズ閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起または細胞体の領域として識別し、

さらに、識別された同一の前記神経突起および同一の前記細胞体を、それぞれ時系列に追跡して、前記生存状態に関係する生存時間を算出する、

請求項3に記載の神経細胞の解析方法。

【請求項5】

前記凝集物検出工程は、

前記細胞領域識別工程にて識別された前記神経突起の領域を前記特定タンパク質の凝集物が存在する領域であると検出し、

前記時系列画像において、前記凝集物の存在領域間の距離が距離閾値よりも近接する複数の前記凝集物を1つの凝集物領域として認識することを含む、

請求項3に記載の神経細胞の解析方法。

30

【請求項6】

前記細胞領域識別工程は、前記時系列画像の前記第1蛍光タンパク質の輝度が、前記第一輝度閾値と異なる第二輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の細胞体の領域として識別し、

前記凝集物検出工程は、前記細胞領域識別工程にて識別された前記細胞体の領域において、前記第1蛍光タンパク質の輝度と第一輝度閾値との比較に基づき前記特定タンパク質の凝集物の有無を検出する、

請求項3に記載の神経細胞の解析方法。

40

【請求項7】

前記細胞領域識別工程は、前記神経細胞内で発現する前記第1蛍光タンパク質とは異なる第2蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、さらに、前記神経細胞の細胞体または神経突起の領域を識別し、

前記凝集物検出工程は、前記第1蛍光タンパク質および前記第2蛍光タンパク質に基づき、識別された前記神経突起内の凝集物が軸索の内部に存在するか、または樹状突起の内部に存在するか否かを検出し、

50

前記解析工程は、前記凝集物検出工程の検出結果に基づき、前記神経突起内の凝集物が前記細胞体に近い側に存在する細胞群と、前記神経突起の末端に近い側に存在する細胞群とに分類し、前記細胞群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析する、

請求項 1 に記載の神経細胞の解析方法。

【請求項 8】

前記第 1 蛍光タンパク質または前記第 2 蛍光タンパク質の前記時系列画像に基づいて、前記神経細胞を構成する前記細胞体と前記神経突起との対応付けを特定する対応付け工程を更に含み、

前記解析工程は、前記対応付け工程で対応付けられた前記細胞体と前記神経突起とに関し、前記凝集物検出工程における前記神経突起内の凝集物の有無および前記細胞体内の凝集物の有無の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の細胞群に分類し、前記細胞群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析することを含む、

10

請求項 7 に記載の神経細胞の解析方法。

【請求項 9】

前記解析工程は、

前記時系列画像に含まれる前記第 1 蛍光タンパク質の輝度に基づいて、前記神経細胞の神経突起または細胞体の輝度が前記第一輝度閾値未満または第二輝度閾値未満の場合に、前記神経細胞が死であると判断し、前記第一輝度閾値未満または第二輝度閾値未満の状態になるまでの時間を前記神経細胞の生存時間として算出し、

前記凝集物検出工程にて検出された神経突起内の凝集物の有無および前記細胞体内の凝集物の有無の検出結果と前記神経細胞の生存時間との関係を表示部に表示することを含む、

20

請求項 3 に記載の神経細胞の解析方法。

【請求項 10】

神経細胞を時系列に撮像した時系列画像を取得する撮像部と、

前記時系列画像に基づいて、前記神経細胞の神経突起の領域あるいは細胞体の領域を識別する識別部と、

前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第 1 蛍光タンパク質を時系列で撮像した前記時系列画像に基づいて、前記識別部で識別された前記神経細胞の前記神経突起の領域あるいは前記細胞体の領域に凝集した前記特定タンパク質の凝集物の有無を、前記時系列画像に含まれる前記第 1 蛍光タンパク質の輝度を基準にして検出する検出部と、

30

前記検出部の検出結果に基づいて前記神経細胞を複数の群に分類し、前記群ごとに前記神経細胞の生存状態を解析する解析部と、

を備え、

前記神経細胞の生存状態は、少なくとも前記神経細胞の生存時間、および生存率のいずれか一つを含み、

前記解析部は、前記複数の群と、前記複数の群の生存状態との関係を、前記群ごとに表示することを含む、

神経細胞の解析装置。

40

【請求項 11】

前記識別部は、

前記撮像部にて前記神経細胞内で発現する特定タンパク質にタグ付けされた第 1 蛍光タンパク質を時系列で撮像し、前記時系列画像の前記第 1 蛍光タンパク質の輝度が第一輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起の領域として識別する、

請求項 10 に記載の神経細胞の解析装置。

【請求項 12】

前記識別部は、

前記時系列画像の前記第 1 蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値を超えた領域の中で、所定のサイズ閾値を超えた領域を前記神経細胞の神経突起または細胞体の領域として

50

識別し、

さらに、識別された同一の前記神経突起および同一の前記細胞体を、それぞれ時系列に追跡して、前記生存状態に関する生存時間を算出する、

請求項 1 1 に記載の神経細胞の解析装置。

【請求項 1 3】

前記検出部は、

前記識別部にて識別された前記神経突起の領域を前記特定タンパク質の凝集物が存在する領域であると検出し、

前記時系列画像において、前記凝集物の存在領域間の距離が距離閾値よりも近接する複数の前記凝集物を 1 つの凝集物領域として認識する、

請求項 1 1 に記載の神経細胞の解析装置。

【請求項 1 4】

前記識別部は、前記時系列画像の前記第 1 蛍光タンパク質の輝度が前記第一輝度閾値と異なる第二輝度閾値を超えた領域を前記神経細胞の細胞体の領域として識別し、

前記検出部は、前記識別された前記細胞体の領域において、前記第 1 蛍光タンパク質の輝度と前記第一輝度閾値との比較に基づき前記特定タンパク質の凝集物の有無を検出する、

請求項 1 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の神経細胞の解析装置。

【請求項 1 5】

命令を内部に有するコンピュータ可読記憶媒体を含むコンピュータプログラムであって

前記命令は、プロセッサまたはプログラム可能回路に実行されると、前記プロセッサまたは前記プログラム可能回路に、

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の神経細胞の解析方法を含む動作を実行させる、コンピュータプログラム。

10

20

30

40

50