

【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6部門第1区分

【発行日】令和4年5月6日(2022.5.6)

【公開番号】特開2020-190459(P2020-190459A)

【公開日】令和2年11月26日(2020.11.26)

【年通号数】公開・登録公報2020-048

【出願番号】特願2019-95499(P2019-95499)

【国際特許分類】

G 01 N 21/17 (2006.01)

10

C 12 Q 1/06 (2006.01)

C 12 M 1/00 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

G 01 N 33/50 (2006.01)

G 01 N 33/483 (2006.01)

【F I】

G 01 N 21/17 A

C 12 Q 1/06

C 12 M 1/00 A

C 12 M 1/34 A

20

G 01 N 33/50 Z

G 01 N 33/483 C

【手続補正書】

【提出日】令和4年4月22日(2022.4.22)

【手続補正1】

【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】

30

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験物質の細胞毒性を評価する方法であって、

前記被験物質の存在下及び非存在下で細胞を培養する工程と、

前記被験物質の存在下の前記細胞を撮像し、第1の画像を得る工程と、

前記被験物質の非存在下の前記細胞を撮像し、第2の画像を得る工程と、

前記第1の画像及び前記第2の画像を比較して、前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程と、を備え、

前記第1の画像を得る工程及び前記第2の画像を得る工程は、前記第1の画像及び前記第2の画像としてそれぞれ定量位相画像を得るために、顕微鏡装置の対物レンズの光軸上に前記細胞を配置する工程と、前記細胞に照明光を照射する工程と、前記光軸に沿って互いに間隔z離れた複数の位置のそれぞれに前記対物レンズの焦点を配置して前記細胞からの光を検出する工程と、検出した前記光に基づいて、前記複数の位置のそれぞれに対応する光強度分布データを生成する工程と、前記光強度分布データに基づいて前記定量位相画像を生成する工程と、を含み、

前記間隔zは、前記対物レンズの開口数NA、前記照明光の波長λ、及び、前記対物レンズと前記細胞との間の屈折率nの少なくとも1つに基づいて設定される、方法。

【請求項2】

前記第1の画像を得る工程及び前記第2の画像を得る工程で、異なる時間において前記細胞を複数回撮像し、

40

50

前記被験物質が細胞毒性を有するか否か判定する工程は、前記第1の画像と前記第2の画像の経時的な変化を比較する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程は、前記被験物質の存在下の細胞及び前記被験物質の非存在下の細胞の、面積、体積、真円度若しくは縦横比、又は、間隙の面積を測定する工程を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記被験物質の存在下の細胞及び前記被験物質の非存在下の細胞が、Organ-on-Chip内に配置されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記間隔zは、更にパラメータkに基づいて設定され、前記kは、生成する前記定量位相画像において位相を復元する空間周波数を示す、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記z、前記NA、前記n、前記kは下記式(100)を満たし、前記kの値は1～25である、請求項5に記載の方法。

【数1】

$$\Delta z = \frac{k\lambda}{5\left(n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}\right)} \quad \dots (100)$$

10

20

30

30

【請求項7】

前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程において、前記第1の画像における前記被験物質の存在下の細胞の短軸方向の長さに対する前記被験物質の存在下の細胞の長軸方向の長さの比が、前記第2の画像における前記被験物質の非存在下の細胞の短軸方向の長さに対する前記被験物質の非存在下の細胞の長軸の長さの比と比較して低下した場合に、前記被験物質が細胞毒性を有すると判定する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程において、前記第1の画像において前記被験物質の存在下の細胞が存在しない領域の面積が、前記第2の画像において前記被験物質の非存在下の細胞が存在しない領域の面積と比較して増加した場合に、前記被験物質が細胞毒性を有すると判定する、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

被験物質の細胞毒性を評価する方法であって、被験物質の存在下で培養された細胞を異なる時間において複数回撮像し、定量位相イメージングにより複数の定量位相画像を生成する工程と、前記複数の定量位相画像における経時的な変化に基づいて、前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程と、前記複数の定量位相画像を生成する工程は、前記定量位相画像を得るために、顕微鏡装置の対物レンズの光軸上に前記細胞を配置する工程と、前記細胞に照明光を照射する工程と、前記光軸に沿って互いに間隔z離れた複数の位置のそれぞれに前記対物レンズの焦点を配置して前記細胞からの光を検出する工程と、検出した前記光に基づいて、前記複数の位置のそれぞれに対応する光強度分布データを生成する工程と、前記光強度分布データに基づいて前記定量位相画像を生成する工程と、を含み、前記間隔zは、前記対物レンズの開口数NA、前記照明光の波長、及び、前記対物レ

40

50

ンズと前記細胞との間の屈折率 n の少なくとも 1 つに基づいて設定される、方法。

【請求項 10】

前記被験物質が細胞毒性を有するか否かを判定する工程は、前記細胞の、面積、体積、真円度若しくは縦横比、又は、間隙の面積を測定する工程を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞が、Organ-on-Chip 内に配置されている、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記間隔 z は、更にパラメータ k に基づいて設定され、前記 k は、生成する前記定量位相画像において位相を復元する空間周波数を示す、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記 z 、前記 NA、前記 n 、前記 k は下記式 (100) を満たし、前記 k の値は 1 ~ 25 である、請求項 12 に記載の方法。

【数 2】

$$\Delta z = \frac{k\lambda}{5\left(n - \sqrt{n^2 - (NA)^2}\right)} \quad \dots (100)$$

20

30

40

50