

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7628074号
(P7628074)

(45)発行日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(24)登録日 令和7年1月30日(2025.1.30)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	D
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
請求項の数 13 (全33頁)				
(21)出願番号	特願2021-508828(P2021-508828)	(73)特許権者	306037311	
(86)(22)出願日	令和2年2月25日(2020.2.25)		富士フイルム株式会社	
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/007479		東京都港区西麻布2丁目2番30号	
(87)国際公開番号	WO2020/195458	(74)代理人	110001519	
(87)国際公開日	令和2年10月1日(2020.10.1)		弁理士法人太陽国際特許事務所	
審査請求日	令和3年5月24日(2021.5.24)	(72)発明者	小倉 隆宏	
審判番号	不服2023-721(P2023-721/J1)		神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地	
審判請求日	令和5年1月16日(2023.1.16)		富士フイルム株式会社内	
(31)優先権主張番号	特願2019-63660(P2019-63660)	(72)発明者	伊藤 晃寿	
(32)優先日	平成31年3月28日(2019.3.28)		神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		富士フイルム株式会社内	
		合議体		
		審判長	中村 浩	
		審判官	福井 悟	
		審判官	長井 啓子	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 測定装置、測定装置の作動プログラム及び測定方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1流路と、前記第1流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第2流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、前記連通部分において前記第1流路と前記第2流路とを仕切る細胞シートとを含む流路デバイスが着脱自在に装着される装着部と、
前記細胞シートに生じる欠陥を通じて前記第1流路から前記第2流路に漏出する、サイズが異なる複数種類のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出部であって、前記複数種類のトレーサが、前記第1流路に送液される、前記細胞シートのバリア性を評価するための評価液において混在している、前記検出部と、
を備え、
前記複数種類のトレーサのそれぞれは、波長域が異なる蛍光を発する蛍光トレーサであり、
前記検出部は、前記複数種類のトレーサがそれぞれ発する複数種類の蛍光を検出した検出信号を出力し、
前記検出部が出力する前記検出信号に基づいて、前記第1流路から前記第2流路に漏出した前記複数種類のトレーサのそれぞれの濃度を導出して、前記複数種類のトレーサのそれぞれの前記濃度に基づいて、前記細胞シートに生じているサイズが異なる欠陥の状態を導出するデータ処理部をさらに備える測定装置。

【請求項2】

前記検出部は、前記複数種類のトレーサのそれぞれに前記蛍光を励起させる励起光を照射する励起光源と、

前記複数種類の蛍光を分離するための光学フィルタと、

前記光学フィルタで分離された前記蛍光を受光する受光部とを有している請求項 1 に記載の測定装置。

【請求項 3】

前記励起光源は 1 つであり、

前記受光部は、前記複数種類の蛍光毎に設けられている請求項 2 に記載の測定装置。

【請求項 4】

前記励起光源は、前記装着部に装着された前記流路デバイスにおいて、前記連通部分から漏出する前記トレーサの流れ方向の下流側であって、前記第 1 流路及び前記第 2 流路のうち、前記第 2 流路にのみ入射する位置に励起光を照射する請求項 3 に記載の測定装置。

10

【請求項 5】

前記漏出状況には、漏出量の時間変化が含まれる請求項 1 から 4 のうちのいずれか 1 項に記載の測定装置。

【請求項 6】

前記データ処理部は、前記検出部の暗電流を補正する補正処理、前記複数種類の光の波長域がオーバーラップする部分を、それぞれの光に対応する検出信号から除去する除去処理、及び電圧信号として出力される前記検出信号を光強度に変換する変換処理のうちの少なくとも 1 つの処理を実行する信号処理部を有している請求項 5 に記載の測定装置。

20

【請求項 7】

前記検出部によって検出された前記漏出状況を、リアルタイムでディスプレイに出力する出力制御部を備えている請求項 1 から 6 のうちのいずれか 1 項に記載の測定装置。

【請求項 8】

前記細胞シートは、支持体上で培養されており、

前記支持体は、直径が 1 μm 以上の孔を有する透過膜である請求項 1 から 7 のうちのいずれか 1 項に記載の測定装置。

【請求項 9】

前記複数種類のトレーサのそれぞれの粒径は、1 nm 以上 100 μm 以下の範囲に含まれる請求項 8 に記載の測定装置。

30

【請求項 10】

前記複数種類のトレーサは、1 nm から数百 nm のオーダの粒径のトレーサと、1 μm から数十 μm のオーダの粒径のトレーサとを含む請求項 9 に記載の測定装置。

【請求項 11】

前記評価液を前記第 1 流路に供給する供給機構を備えている請求項 1 から 10 のうちのいずれか 1 項に記載の測定装置。

【請求項 12】

第 1 流路と、前記第 1 流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第 2 流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、前記連通部分において前記第 1 流路と前記第 2 流路とを仕切る細胞シートとを含む流路デバイスを用いて、細胞シートのバリア性を評価するための測定装置の作動プログラムであって、

40

前記細胞シートに生じる欠陥を通じて前記第 1 流路から前記第 2 流路に漏出する、サイズが異なる複数種類のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出部からの検出信号を取得する取得部であって、前記複数種類のトレーサが、前記第 1 流路に送液される、前記細胞シートのバリア性を評価するための評価液において混在しており、前記複数種類のトレーサのそれぞれは、波長域が異なる蛍光を発する蛍光トレーサであり、前記検出部が、前記複数種類のトレーサがそれぞれ発する複数種類の蛍光を検出することで、前記複数種類のトレーサのそれぞれを区別して漏出状況を検出する検出信号を取得する取得部と、

取得された前記検出信号に基づいて、前記第 1 流路から前記第 2 流路に漏出した前記複

50

数種類のトレーサのそれぞれの濃度を導出して、前記複数種類のトレーサのそれぞれの前記濃度に基づいて、前記細胞シートに生じているサイズが異なる欠陥の状態を導出するデータ処理部と、

前記データ処理部によって導出された測定結果に応じて、前記サイズが異なる欠陥の状態を出力する出力制御処理を実行する処理部として、

コンピュータを機能させる測定装置の作動プログラム。

【請求項 13】

第1流路と、前記第1流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第2流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、前記連通部分において前記第1流路と前記第2流路とを仕切る細胞シートとを含む流路デバイスを用い、

10

前記細胞シートのバリア性を評価するための評価液であって、サイズが異なり、複数種類のトレーサが混在する評価液を前記第1流路に送液する送液ステップと、

前記細胞シートに生じる欠陥を通じて前記第1流路から前記第2流路に漏出する前記複数種類のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出ステップと、

を備え、

前記複数種類のトレーサのそれぞれは、波長域が異なる蛍光を発する蛍光トレーサであり、

前記検出ステップは、前記複数種類のトレーサがそれぞれ発する複数種類の蛍光を検出した検出信号を出力し、

前記検出ステップが出力する前記検出信号に基づいて、前記第1流路から前記第2流路に漏出した前記複数種類のトレーサのそれぞれの濃度を導出して、前記複数種類のトレーサのそれぞれの前記濃度に基づいて、前記細胞シートに生じているサイズが異なる欠陥の状態を導出するデータ処理ステップをさらに備える測定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示の技術は、測定装置、測定装置の作動プログラム及び測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

液体を送液可能な微細な流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートとを備えた流路デバイスが知られている（特表2018-522586号公報参照）。こうした流路デバイスは、例えば、細胞シートのバリア性を評価するために用いられる。

【0003】

細胞シートのバリア性の評価には、トレーサを含む評価液が使用される。細胞シートに欠陥が生じている場合は、欠陥を通じて、評価液に含まれるトレーサが漏出する。この場合、細胞シートのバリア性は、欠陥が無い状態と比較して低下したと評価される。このように、細胞シートのバリア性の評価は、細胞シートの欠陥を検出することを通じて行われる。

40

【0004】

細胞シートのバリア性の評価は、一例として、薬剤の効能又は副作用を調べるために行われる。すなわち、薬剤と細胞シートとを接触させた場合の細胞シート上の欠陥を検出することにより、薬剤の効能又は副作用が調べられる。また、別の例として、細胞シートのバリア性の評価は、流路デバイスを製造するメーカーが、製品出荷前の検査において、流路デバイス内の細胞シートに欠陥が生じていないことを確認するために行われる。また、細胞シートのバリア性の評価は、流路デバイス11の開発において、細胞シートが仕様等に合致しているか否かの検査のために行われる。

【0005】

特表2018-522586号公報において、細胞シートのバリア性を評価する方法は

50

、次のとおりである。まず、特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報に記載の流路デバイスは、第 1 流路（灌流チャネル）と、第 2 流路（ゲルチャネル）の 2 つの流路を有している（段落 0 1 5 5、図 1 A、図 1 B）。第 1 流路と第 2 流路とは一部が連通しており、連通部分は、細胞シートによって仕切られている。

【 0 0 0 6 】

特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報に記載の方法では、こうした流路デバイスの第 1 流路に、細胞シートのバリア性を評価するための評価液が注入される。評価液には、トレーサの一例として蛍光プローブが用いられ、蛍光プローブの溶媒として培地が使用される。細胞シートに欠陥がなく、バリア性が完全であれば、蛍光プローブは第 2 流路には漏出しない。一方、細胞シートに欠陥がある場合は、蛍光プローブは第 2 流路に流出する。こうした漏出状況が蛍光顕微鏡を使用して観察される（段落 0 1 5 5、図 1 から図 3）。また、特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報には、トレーサ（蛍光プローブ）として、サイズが異なる複数種類のトレーサ（蛍光プローブ）を用いてもよいことが記載されている（段落 0 1 5 5、図 1 6）

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

細胞シートの欠陥の種類には、例えば、死滅した細胞などの一部の細胞が細胞シートから脱落することにより生じる欠陥、隣接する細胞間の密着結合（タイトジャンクション）が破壊されることにより生じる欠陥、及び細胞シートの一部が剥離することにより生じる欠陥など、様々なものがある。また、これらの欠陥のサイズも様々である。例えば、密着結合の破壊により生じる欠陥は、1 nm（nanometer）から数十 nm のオーダーであるのに対して、細胞の脱落及び細胞シートの部分的な剥離により生じる欠陥は、1 μ m（micrometer）から数十 μ m のオーダーである。

20

【 0 0 0 8 】

細胞シートのバリア性の評価に際しては、単に欠陥の有無を検出するだけでなく、例えば、細胞シートに生じた欠陥のおおよそのサイズ、及びサイズが異なる欠陥のそれぞれがおおよその程度の割合で存在するか、といったより詳細な欠陥の状態を検出することが要望されている。というのも、こうしたより詳細な欠陥状態を検出することで、単に欠陥の有無を検出する場合と比較して、細胞シートのバリア性をより詳細に評価できるためである。

30

【 0 0 0 9 】

上述したとおり、特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報には、トレーサ（蛍光プローブ）としては、サイズが異なる複数種類のトレーサを使用してもよい旨が記載されている。ただし、特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報には、サイズが異なる複数種類のトレーサの使用目的、及び使用方法について明確な記載はない。

【 0 0 1 0 】

こうしたサイズが異なる複数種類のトレーサを次のように使用することにより、複数種類のサイズの欠陥を検出することが考えられる。すなわち、まず、比較的大きなサイズ（大サイズ）のトレーサを含む評価液を使用して、大サイズの欠陥を検出する。大サイズのトレーサは、大サイズの欠陥のみ透過する。そのため、大サイズのトレーサの漏出は、大サイズの欠陥が存在することを示している。

40

【 0 0 1 1 】

また、細胞シートに大サイズの欠陥が存在しない場合において、比較的小さなサイズの小サイズのトレーサを含む評価液を使用して、小サイズの欠陥を検出する。細胞シートに大サイズの欠陥が存在しない場合、徐々にトレーサのサイズを小さくすることにより、小サイズの欠陥を検出することができる。

【 0 0 1 2 】

このようにサイズが異なるトレーサをそれぞれ含む複数種類の評価液を用いて、これらを順番に流路デバイスに入れ替えながら欠陥の検出を行うことで、細胞シートにどのよう

50

なサイズの欠陥が生じているかを検出することができる。

【 0 0 1 3 】

しかしながら、このようにサイズが異なるトレーサを含有する複数種類の評価液を使い分ける方法は、評価液の入れ替えが必要となるため、時間と手間が掛るという問題があった。

【 0 0 1 4 】

本開示の技術は、従来と比べて、時間と手間を掛けることなく、細胞シートに生じるサイズが異なる複数種類の欠陥を検出することが可能な細胞シートのバリア性評価に用いられる測定装置、測定装置の作動プログラム及び測定方法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】

【 0 0 1 5 】

上記目的を達成するために、本開示の技術に係る測定装置は、第 1 流路と、第 1 流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第 2 流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、連通部分において第 1 流路と第 2 流路とを仕切る細胞シートを含む流路デバイスが着脱自在に装着される装着部と、細胞シートのバリア性を評価するための評価液であって、サイズが異なる複数種類のトレーサが混在する評価液が第 1 流路に送液された場合において、細胞シートに生じる欠陥を通じて第 1 流路から第 2 流路に漏出する複数のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出部と、を備えている。

【 0 0 1 6 】

複数種類のトレーサのそれぞれは、波長域が異なる蛍光を発する蛍光トレーサであり、検出部は、複数種類のトレーサがそれぞれ発する複数種類の蛍光を検出することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

検出部は、複数種類のトレーサのそれぞれに蛍光を励起させる励起光を照射する励起光源と、複数種類の蛍光を分離するための光学フィルタと、光学フィルタで分離された蛍光を受光する受光部とを有していることが好ましい。

【 0 0 1 8 】

励起光源は 1 つであり、受光部は、複数種類の蛍光毎に設けられていることが好ましい。

【 0 0 1 9 】

励起光源は、装着部に装着された流路デバイスにおいて、連通部分から漏出するトレーサの流れ方向の下流側であって、第 1 流路及び第 2 流路のうち、第 2 流路にのみ入射する位置に励起光を照射することが好ましい。

【 0 0 2 0 】

漏出状況には、漏出量の時間変化が含まれることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

検出部が出力する検出信号に対して、データ処理を施すデータ処理部を備えていることが好ましい。

【 0 0 2 2 】

データ処理部は、検出部の暗電流を補正する補正処理、複数種類の光の波長域がオーバーラップする部分を、それぞれの光に対応する検出信号から除去する除去処理、及び電圧信号として出力される検出信号を光強度に変換する変換処理のうちの少なくとも 1 つの処理を実行する信号処理部を有していることが好ましい。

【 0 0 2 3 】

データ処理部は、検出部が出力する検出信号に基づいて、第 1 流路から第 2 流路に漏出した複数種類のトレーサのそれぞれの濃度を導出する濃度導出部を有していることが好ましい。

【 0 0 2 4 】

データ処理部は、複数種類のトレーサのそれぞれの濃度に基づいて、細胞シートに生じている欠陥の状態を導出する欠陥状態導出部を有していることが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

検出部によって検出された漏出状況を、リアルタイムでディスプレイに出力する出力制御部を備えていることが好ましい。

【 0 0 2 6 】

細胞シートは、支持体上で培養されており、支持体は、直径が $1\ \mu\text{m}$ 以上の孔を有する透過膜であることが好ましい。

【 0 0 2 7 】

複数種類のトレーサのそれぞれの粒径は、 $1\ \text{nm}$ 以上 $100\ \mu\text{m}$ 以下の範囲に含まれることが好ましい。

【 0 0 2 8 】

複数種類のトレーサは、 $1\ \text{nm}$ から数百 nm のオーダの粒径のトレーサと、 $1\ \mu\text{m}$ から数十 μm のオーダの粒径のトレーサとを含むことが好ましい。

【 0 0 2 9 】

評価液を第 1 流路に供給する供給機構を備えていることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

本開示の技術に係る測定装置の作動プログラムは、第 1 流路と、第 1 流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第 2 流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、連通部分において第 1 流路と第 2 流路とを仕切る細胞シートを含む流路デバイスを用いて、細胞シートのバリア性を評価するための測定装置の作動プログラムであって、細胞シートのバリア性を評価するための評価液であって、サイズが異なる複数種類のトレーサが混在する評価液が第 1 流路に送液された場合において、細胞シートに生じる欠陥を通じて第 1 流路から第 2 流路に漏出する複数のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出部からの検出信号を取得する取得部と、取得された検出信号に基づいて漏出状況を出力する出力制御処理を実行する処理部として、コンピュータを機能させる。

【 0 0 3 1 】

本開示の技術に係る測定方法は、第 1 流路と、第 1 流路の少なくとも一部と連通する連通部分を有する第 2 流路と、培養された複数の細胞が結合された状態で配列された細胞シートであって、連通部分において第 1 流路と第 2 流路とを仕切る細胞シートを含む流路デバイスを用い、細胞シートのバリア性を評価するための評価液であって、サイズが異なり、複数種類のトレーサが混在する評価液を第 1 流路に送液する送液ステップと、細胞シートに生じる欠陥を通じて第 1 流路から第 2 流路に漏出する複数のトレーサのそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出ステップと、を備えている。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

本開示の技術によれば、従来と比べて、時間と手間を掛けることなく、細胞シートに生じるサイズが異なる複数種類の欠陥を検出することが可能な細胞シートのバリア性評価に用いられる測定装置、測定装置の作動プログラム及び測定方法を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】 細胞シートのバリア性評価装置の全体構成図である。

【 図 2 】 流路デバイスの分解斜視図である。

【 図 3 】 流路デバイスの横断面図である。

【 図 4 】 流路デバイスの縦断面図である。

【 図 5 】 第 1 流路及び第 2 流路の重なりを示す平面図である。

【 図 6 】 透過膜の説明図である。

【 図 7 】 透過膜の孔の直径とトレーサの粒径の説明図である。

【 図 8 】 透過膜に形成された細胞シートの説明図である。

【 図 9 】 細胞シートに生じる欠陥の説明図である。

【 図 10 】 評価液を第 1 流路に送液した状態の説明図である。図 10 A は、細胞シートに

10

20

30

40

50

欠損が無い場合の評価液の流れを示す説明図であり、図 10 B は、細胞シートに欠損が生じた場合の評価液の流れを示す説明図である。

【図 11】検出部の外観斜視図である。

【図 12】検出部の光学部品の構成を示す説明図である。図 12 A は、平面図であり、図 12 B は、側面図である。

【図 13】図 13 は、フィルタの特性を示す説明図である。図 13 A は、第 1 フィルタの特性を示し、図 13 B は、第 2 フィルタの特性を示し、図 13 C は、第 3 フィルタの特性を示す。

【図 14】各トレーサが発する蛍光の波長を示す説明図である。図 14 A は、第 1 トレーサの蛍光の波長を示し、図 14 B は、第 2 トレーサの蛍光の波長を示し、図 14 C は、第 3 トレーサの蛍光の波長を示す。

10

【図 15】各トレーサが発する蛍光の波長と各フィルタの特性との関係を示す説明図である。

【図 16】各受光部が出力する検出信号の説明図である。

【図 17】制御装置として機能するコンピュータの概略構成図を示す。

【図 18】制御装置の機能ブロックの説明図である。

【図 19】信号処理の説明図である。

【図 20】濃度導出処理の説明図である。

【図 21】各トレーサが透過可能な欠損のサイズとの対応関係を示す説明図である。

【図 22】細胞シート上の欠陥の総面積と各トレーサの漏出量の指標（濃度）との関係を示すグラフである。

20

【図 23】欠陥状態導出処理の概要の説明図である。

【図 24】欠陥状態導出処理の詳細の説明図である。

【図 25】測定結果表示画面の説明図である。

【図 26】測定処理の手順を示すフローチャートである。

【図 27】比較例の測定処理の手順を示すフローチャートである。

【図 28】透過膜の両面に細胞シートを形成する例を示す説明図である。

【図 29】図 28 の例において、細胞シートに欠陥が生じた状態を示す説明図である。

【図 30】回転フィルタユニットを有する検出部の例を示す説明図である。

【図 31】図 30 の回転フィルタユニットの各フィルタの特性を示す説明図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0034】

図 1 に一例として示すように、測定装置 10 は、流路デバイス 11 内に形成された細胞シート 20（図 8 及び図 9 も参照）のバリア性の評価に用いられる。細胞シート 20 は、流路デバイス 11 内において、播種及び培養されることによって形成される。測定装置 10 には、細胞シート 20 が形成された流路デバイス 11 が着脱自在にセットされる。そして、測定装置 10 は、セットされた流路デバイス 11 内の細胞シート 20 のバリア性を評価するために、その評価の指標となるデータを測定する。バリア性の評価の指標となるデータとしては、例えば、細胞シート 20 に生じる欠陥の有無に加えて、サイズ違いの欠陥の割合などを含む欠陥の状態等がある。

40

【0035】

測定装置 10 は、一例として、流路デバイス 11 を製造するメーカーが、流路デバイス 11 を開発する際に、流路デバイス 11 内に形成された細胞シート 20 のバリア性を評価するために用いられる。

【0036】

測定装置 10 は、検出装置 12 と、制御装置 13 とを備えている。検出装置 12 は、装着部 16 と、検出部 17 とを備えている。装着部 16 は、流路デバイス 11 が着脱自在に装着される。

【0037】

検出部 17 は、後に詳述するように、流路デバイス 11 に対して、細胞シート 20 のバ

50

リア性を評価するための評価液 2 1 が送液された場合において、細胞シート 2 0 に生じる欠陥を通じて漏出する蛍光トレーサ T R (図 8 及び図 9 参照) の漏出状況を光学的に検出する。評価液 2 1 は、蛍光トレーサ T R を、バッファなどの溶媒に含有させたものである。トレーサとは、液体など流体の流れ、又は特定の物質を追跡するために使われる物質をいう。蛍光トレーサ T R は、蛍光を発するトレーサをいい、具体的には、蛍光トレーサ T R としては、蛍光物質そのもの又は蛍光物質で標識された物質などが使用される。検出部 1 7 は、漏出した蛍光トレーサ T R が発する蛍光 F L を検出することを通じて、漏出状況を検出する。

【 0 0 3 8 】

制御装置 1 3 は、検出部 1 7 の動作を制御する。さらに、制御装置 1 3 は、検出部 1 7 が出力する検出信号を取得し、取得した検出信号にデータ処理を施す。これにより、検出信号に基づく種々の測定結果を出力する。制御装置 1 3 は、例えばコンピュータで構成される。

10

【 0 0 3 9 】

測定装置 1 0 は、さらに、装着部 1 6 に装着された流路デバイス 1 1 に対して、評価液 2 1 などの液体を供給するための供給機構 2 2 を備えている。供給機構 2 2 は、供給チューブ 2 2 A と、排出チューブ 2 2 B と、ポンプ 2 2 C とを備えている。供給チューブ 2 2 A 及び排出チューブ 2 2 B は、装着部 1 6 に装着された流路デバイス 1 1 に対して取り付けられる。

【 0 0 4 0 】

20

流路デバイス 1 1 は、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 の 2 つの流路を備えている。供給チューブ 2 2 A 及び排出チューブ 2 2 B は、それぞれ 2 本ずつ設けられており、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 のそれぞれに取り付けられる。

【 0 0 4 1 】

第 1 流路 2 5 に取り付けられる供給チューブ 2 2 A には、ポンプ 2 2 C が接続される。ポンプ 2 2 C は、例えば、シリンジポンプである。ポンプ 2 2 C は、供給チューブ 2 2 A を通じて、第 1 流路 2 5 に評価液 2 1 を供給する。後述するように、第 1 流路 2 5 と第 2 流路 2 6 とは、一部が連通しており、細胞シート 2 0 は、この連通部分において第 1 流路 2 5 と第 2 流路 2 6 とを仕切る。

【 0 0 4 2 】

30

細胞シート 2 0 に欠損が生じていない場合は、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 の連通部分は、細胞シート 2 0 によって封止される。そのため、細胞シート 2 0 に欠損が生じていない場合は、第 1 流路 2 5 に評価液 2 1 が送液された場合において、評価液 2 1 に含まれる蛍光トレーサ T R が第 2 流路 2 6 に漏出することはない。第 1 流路 2 5 に供給された評価液 2 1 は、第 1 流路 2 5 を通過した後、排出チューブ 2 2 B から排出される。

【 0 0 4 3 】

これに対して、細胞シート 2 0 に欠損が生じている場合は、第 1 流路 2 5 に供給された評価液 2 1 内の蛍光トレーサ T R は、欠損を通じて第 2 流路 2 6 に漏出する。細胞シート 2 0 に欠損が生じている場合は、評価液 2 1 の一部である漏出液 2 1 A が第 2 流路 2 6 に流入する。漏出液 2 1 A には蛍光トレーサ T R が含まれている。漏出液 2 1 A は、第 2 流路 2 6 を通過した後、排出チューブ 2 2 B から排出される。

40

【 0 0 4 4 】

なお、第 2 流路 2 6 に取り付けられる供給チューブ 2 2 A は、第 2 流路 2 6 に、バッファ 3 0 (図 3 等参照) を供給するために用いられる。バッファ 3 0 としては、例えば、T B S (Tris Buffered Saline : トリス緩衝生理食塩水) 、及び H B S S (Hanks' Balanced Salt Solution : 平衡塩溶液) 等が用いられる。バッファ 3 0 は、例えば、上述した評価液 2 1 の溶媒として使用されるバッファと同様である。

【 0 0 4 5 】

図 2 に示すように、流路デバイス 1 1 は、第 1 流路部材 3 1 と、第 2 流路部材 3 2 と、保持プレート 3 3 と、補強板 3 4 と、透過膜 3 6 とを備えている。第 1 流路部材 3 1 には

50

、図 2 において下側の下面に第 1 流路 2 5 が形成されている。第 2 流路部材 3 2 には、図 2 において上側の上面に第 2 流路 2 6 が形成されている。第 1 流路部材 3 1 と第 2 流路部材 3 2 とは、第 1 流路 2 5 と第 2 流路 2 6 とが対向して配置されるように組み立てられる。

【 0 0 4 6 】

第 1 流路部材 3 1 は、一例として P D M S (ポリジメチルシロキサン) 等の弾性を有する透明な樹脂材料で構成されており、第 2 流路部材 3 2 は、一例として C O P (シクロオレフィンポリマー) 等の剛性を有する透明な樹脂材料で構成されている。

【 0 0 4 7 】

第 1 流路部材 3 1 には、第 1 流路 2 5 に接続する注入路 3 7 及び排出路 3 8 が形成されている。また、第 1 流路部材 3 1 には、第 2 流路 2 6 に接続する注入路 3 7 及び排出路 3 8 も形成されている。すなわち、注入路 3 7 及び排出路 3 8 は、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 のそれぞれに対応して 2 つずつ設けられている。注入路 3 7 及び排出路 3 8 は、第 1 流路部材 3 1 の上下方向、すなわち、厚み方向に貫通する貫通路である。

【 0 0 4 8 】

保持プレート 3 3 は、第 1 流路部材 3 1 の上面に配置される。保持プレート 3 3 には、第 1 流路部材 3 1 の注入路 3 7 及び排出路 3 8 のそれぞれに対応する位置に、注入口 3 3 A 及び排出口 3 3 B が形成されている。注入口 3 3 A 及び排出口 3 3 B には、供給チューブ 2 2 A 及び排出チューブ 2 2 B のそれぞれが接続される。

【 0 0 4 9 】

補強板 3 4 は、流路デバイス 1 1 の剛性を補強する。補強板 3 4 は、第 1 流路部材 3 1 及び第 2 流路部材 3 2 の間に配置される。補強板 3 4 において、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 に対応する位置には、第 1 流路 2 5 において評価液 2 1 が流れる方向に沿って細長く形成されたスリット 3 4 A が形成されている。スリット 3 4 A は、第 1 流路 2 5 と第 2 流路 2 6 との連通部分に配置される。また、補強板 3 4 には、開口 3 4 B が形成されている。開口 3 4 B は、第 2 流路部材 3 2 の第 2 流路 2 6 の両端に形成された接続部 2 6 B (図 5 参照) に対応する位置に配置されている。また、開口 3 4 B は、第 1 流路部材 3 1 において、第 2 流路 2 6 用に形成された注入路 3 7 及び排出路 3 8 と接続する。

【 0 0 5 0 】

透過膜 3 6 は、第 1 流路部材 3 1 と補強板 3 4 との間に配置され、かつ、スリット 3 4 A に対応する位置に配置される。透過膜 3 6 は、細胞シート 2 0 の支持体として機能し、細胞シート 2 0 は、透過膜 3 6 上で播種及び培養される。また、透過膜 3 6 は、評価液 2 1 に含まれる蛍光トレーサ T R (図 8 及び図 9 等参照) を透過する。

【 0 0 5 1 】

保持プレート 3 3、第 1 流路部材 3 1、補強板 3 4、及び第 2 流路部材 3 2 には、それぞれボルト 4 1 を挿通するためのネジ穴 4 2 が形成されている。保持プレート 3 3、第 1 流路部材 3 1、補強板 3 4、及び第 2 流路部材 3 2 は、この順で積層されることにより、流路デバイス 1 1 として組み立てられる。そして、流路デバイス 1 1 は、組み立てられた状態で、ボルト 4 1 とナット 4 3 とによって締結される。

【 0 0 5 2 】

図 3 から図 5 に示すように、流路デバイス 1 1 が組み立てられた状態において、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 は、それぞれの直線部分 2 5 A 及び 2 6 A (図 5 参照) が対向する。図 3 は、流路デバイス 1 1 の横断面図であり、図 4 は、流路デバイス 1 1 の縦断面図であり、図 5 は、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 の重なりを示す平面図である。

【 0 0 5 3 】

図 4 に示すように、第 1 流路 2 5 の直線部分 2 5 A の幅 W 1 は、一例として、約 2 0 0 μ m 程度であり、第 2 流路 2 6 の直線部分 2 6 A の幅 W 2 は、一例として、約 4 0 0 μ m である。図 5 に示すように、直線部分 2 5 A 及び直線部分 2 6 A の一部は重なる。この位置にスリット 3 4 A が配置されており、このスリット 3 4 A に対応する部分が、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 のそれぞれの連通部分となる。また、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 は、ミクロンオーダーの幅の流路を有することから、流路デバイス 1 1 は、マイクロ流路

10

20

30

40

50

デバイス又はマイクロ流体デバイスなどとも呼ばれる。

【 0 0 5 4 】

細胞シート 2 0 は、透過膜 3 6 の第 1 流路 2 5 側の面に形成される。細胞シート 2 0 は、直線部分 2 5 A 及び直線部分 2 6 A の連通部分に形成され、直線部分 2 5 A 及び 2 6 A において第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 を仕切る。

【 0 0 5 5 】

図 3 において、二点鎖線の矢印で示すように、細胞シート 2 0 に欠陥が生じた場合は、第 1 流路 2 5 内の評価液 2 1 の一部が透過膜 3 6 及びスリット 3 4 A を通じて第 2 流路 2 6 に蛍光トレーサ T R (図 8 及び図 9 等) を含む漏出液 2 1 A が漏出する。

【 0 0 5 6 】

図 5 において、第 1 流路 2 5 の直線部分 2 5 A の上流端と下流端には、注入路 3 7 及び排出路 3 8 に接続する接続部 2 5 B が形成されている。また、第 2 流路 2 6 の直線部分 2 6 A の上流端と下流端には、注入路 3 7 及び排出路 3 8 に接続する接続部 2 6 B が形成されている。

【 0 0 5 7 】

図 6 に示すように、透過膜 3 6 は、多数の孔 3 6 A が形成された多孔質膜である。透過膜 3 6 は、一例として疎水性の有機溶媒に溶解可能な疎水性ポリマーから成る。疎水性ポリマーとしては、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリカーボネート、ポリプロピレンなどのポリマーが挙げられる。これらのポリマーは、1 種単独で又は 2 種以上を混合して使用してよい。また、透過膜 3 6 の素材は疎水性ポリマーには限られず、細胞の接着性の観点等から種々の素材を選択することが可能である。

【 0 0 5 8 】

図 7 に示すように、透過膜 3 6 の孔 3 6 A の直径 D は、評価液 2 1 に含まれる蛍光トレーサ T R を透過可能なサイズである。本例では、直径 D は $1\ \mu\text{m}$ 以上である。本例の透過膜 3 6 は、複数の孔 3 6 A がハニカム配列されたハニカムフィルムである。もちろん、複数の孔 3 6 A が正方配列されたフィルムを用いてもよい。孔 3 6 A の直径 D は、一例として、約 $5\ \mu\text{m}$ から約 $20\ \mu\text{m}$ であり、本例では約 $20\ \mu\text{m}$ である。開口率は、一例として、約 20 % から約 50 % であり、本例においては約 50 % である。なお、開口率は、50 % 以上でもよい。

【 0 0 5 9 】

評価液 2 1 には、サイズ、具体的には粒径が異なる複数種類の蛍光トレーサ T R が含まれる。本例では、サイズ違いの 3 種類の蛍光トレーサ T R 1、T R 2、及び T R 3 が含有されている。本明細書において、サイズ違いの 3 種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれを区別する必要がある場合は、T R 1 から T R 3 のように、符号 T R に数字を付した符号を用いるが、サイズ違いの 3 種類の蛍光トレーサ T R を区別する必要が無い場合は、数字を省略して単に符号 T R を使用する。

【 0 0 6 0 】

蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれは、励起光の照射により蛍光を発するトレーサである。蛍光の波長域は、後述するように、サイズが異なる 3 種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 毎に異なる。

【 0 0 6 1 】

また、3 種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれのサイズ (粒径) は、一例として、 $1\ \text{nm}$ 以上 $100\ \mu\text{m}$ 以下の範囲に含まれる。本例においては、孔 3 6 A の直径 D が $20\ \mu\text{m}$ なので、蛍光トレーサ T R も $20\ \mu\text{m}$ 未満のものが使用される。

【 0 0 6 2 】

具体的には、蛍光トレーサ T R 1 は、数 nm から数十 nm 程度のサイズであり、3 種類の中では最小である。蛍光トレーサ T R 3 は、 $6\ \mu\text{m}$ から $8\ \mu\text{m}$ 程度のサイズであり、3 種類の中では最大である。蛍光トレーサ T R 2 は、 $200\ \text{nm}$ から $300\ \text{nm}$ 程度のサイズであり、蛍光トレーサ T R 1 と蛍光トレーサ T R 2 の中間のサイズである。このように

10

20

30

40

50

、サイズ違いの蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 としては、本例においては、1 n m から数十 n m のオーダのサイズ（粒径）の蛍光トレーサ T R 1 と、数百 n m のオーダのサイズ（粒径）の蛍光トレーサ T R 2 と、1 μ m から 1 0 μ m のオーダのサイズ（粒径）の蛍光トレーサ T R 3 とが含まれる。

【 0 0 6 3 】

蛍光トレーサ T R としては、例えば、1 n m のサイズ（粒径）の蛍光分子、数 n m から 1 0 0 n m の各種のサイズ（粒径）のデキストラン、及び 1 0 n m から 1 0 0 μ m の各種のサイズ（粒径）の蛍光ビーズなどを使用することができる。デキストランとしては、例えば、フルオレセイン、アレクサ、及びテトラメチルローダミン等がある。また、蛍光トレーサ T R としては、蛍光色素で標識された赤血球を使用してもよい。赤血球のサイズ（粒径）は、約 6 μ m から約 8 μ m である。評価液 2 1 に含有される蛍光トレーサ T R のサイズの組み合わせは、これらの蛍光トレーサの中から適宜選択される。

10

【 0 0 6 4 】

図 8 に示すように、細胞シート 2 0 は、透過膜 3 6 上に複数の細胞 2 0 A が結合された状態で配列されたものである。細胞シート 2 0 は、例えば次のように形成される。まず、流路デバイス 1 1 の製造時において、第 1 流路 2 5 を通じて培地及び細胞 2 0 A を透過膜 3 6 に供給する。これにより、透過膜 3 6 上で細胞が培養され、透過膜 3 6 上に複数の細胞 2 0 A が結合された状態で配列される。培養された細胞シート 2 0 は透過膜 3 6 に吸着する。

【 0 0 6 5 】

20

流路デバイス 1 1 の第 1 流路 2 5 は、例えば、血管としてシミュレートされる。この場合は、細胞シート 2 0 としては、例えば、血管の内壁を構成する内皮細胞が形成される。内皮細胞には、細胞 2 0 A 間に密着結合（タイトジャンクション）2 0 B が形成される。密着結合は、細胞 2 0 A 同士が接着したときに発現するタンパク質である。細胞シート 2 0 のように密着結合がある細胞シートは、細胞 2 0 A 間が隙間なく形成される。このような密着結合 2 0 B を有する細胞シート 2 0 は、欠陥が生じていない場合は高いバリア性を有している。

【 0 0 6 6 】

図 9 に示すように、細胞シート 2 0 の欠陥 D F の種類には、例えば、隣接する細胞 2 0 A 間の密着結合 2 0 B が破壊されることにより生じる欠陥 D F 1、死滅した細胞などの一部の細胞 2 0 A が細胞シート 2 0 から脱落することにより生じる欠陥 D F 2、細胞シート 2 0 の一部が剥離することにより生じる欠陥 D F 3 というように様々なものがある。細胞シート 2 0 の部分的な剥離による欠陥 D F 3 は、例えば、細胞 2 0 A の透過膜 3 6 に対する吸着が不完全な部分が、第 1 流路 2 5 を流れる液体と接触することによって引き起こされる。

30

【 0 0 6 7 】

流路デバイス 1 1 のように、微細な第 1 流路 2 5 内に細胞シート 2 0 が設けられる場合は、第 1 流路 2 5 内を流れる液体の流体抵抗は大きい。そのため、液体と細胞シート 2 0 とが接触した場合、細胞シート 2 0 の剥離が生じやすい。

【 0 0 6 8 】

40

これらの欠陥 D F 1 から D F 2 3 のサイズは様々である。例えば、密着結合 2 0 B の破壊により生じる欠陥 D F 1 のサイズは、数 n m から数十 n m のオーダであるのに対して、細胞 2 0 A の脱落により生じる欠陥 D F 2 のサイズは、数百 n m のオーダであり、細胞シート 2 0 の部分的な剥離により生じる欠陥 D F 3 は、1 μ m から 1 0 0 μ m のオーダである。欠陥 D F 1 から D F 3 のうち、欠陥 D F 1 は、サイズが最も小さい（小サイズ）。欠陥 D F 3 は、サイズが最大である（大サイズ）。欠陥 D F 2 は、中サイズである。ここで、欠陥 D F 1 から D F 3 についても、蛍光トレーサ T R と同様に、各欠陥 D F 1 から D F 3 を区別することなく、総称する場合は、数字を付すこと無く、単に欠陥 D F と呼ぶ。

【 0 0 6 9 】

小サイズの欠陥 D F 1 は、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 が透過可能なサイズであり、

50

中サイズの欠陥DF2は、中サイズの蛍光トレーサTR2が透過可能なサイズであり、大サイズの欠陥DF3は、大サイズの蛍光トレーサTR3が透過可能なサイズである。

【0070】

図10に示すように、第1流路25に対して、3種類のサイズの蛍光トレーサTR1からTR3が混在する評価液21を流すと、図10Aに示すように、細胞シート20に欠陥DFが生じていない場合は、第2流路26への蛍光トレーサTR1からTR3を含む漏出液21Aの漏出はない。これに対して、図10Bに示すように、細胞シート20に欠陥DFが生じると、欠陥DFのサイズに応じて、3種類のサイズの蛍光トレーサTR1からTR3のうち、少なくとも小サイズの蛍光トレーサTR1を含む漏出液21Aが漏出する。

【0071】

符号46は、検出部17が、蛍光トレーサTRを含む漏出液21Aの漏出状況を検出する検出位置を示す。検出位置46は、連通部分であるスリット34Aに対応する位置から漏出する蛍光トレーサTRの流れ方向の下流側であって、第1流路25及び第2流路26のうち、第2流路26にのみ励起光が入射する位置に設定される。

【0072】

後述するように、検出部17は、励起光を照射する励起光源56（図11参照）を有している。すなわち、励起光源56は、装着部16に装着された流路デバイス11において、連通部分に対応するスリット34A及び細胞シート20の欠陥DFから漏出する評価液21の流れ方向の下流側であって、第1流路25及び第2流路26のうち、第2流路26にのみ入射する位置に励起光を照射する。

【0073】

図11に示すように、検出部17は、第1検出器51と、第2検出器52と、第3検出器53と、第1鏡胴部54と、第2鏡胴部55と、励起光源56と、シャッタ部57と、対物レンズ58とを備えている。励起光源56は、例えば半導体レーザなどのレーザ光源であり、励起光として、例えば、中心波長が476nmの励起光LB（図12参照）を発する。

【0074】

シャッタ部57は、励起光源56の照射方向の前方に配置される。シャッタ部57は、励起光を遮蔽するシャッタ57Aを開き位置と閉じ位置との間で移動させる。一例として、シャッタ57Aは、電動で動作する電動シャッタである。シャッタ57Aが開き位置にあるときに、励起光LBが第1鏡胴部54内に入射する。一方、シャッタ57Aが閉じ位置にあるときはシャッタ57Aによって励起光LBが遮蔽されて、励起光LBの入射が禁止される。

【0075】

図12は、主として第1鏡胴部54内の光学部品の構成を示す。図12Aは、第1鏡胴部54の内部を平面視した平面図である。図12Bは、第1鏡胴部54の内部を側面視した側面図である。第1鏡胴部54内には、ダイクロイックミラーDM0からDM3、及び集光レンズ59などの光学部品が設けられている。ダイクロイックミラーDM0からDM3は特定の波長域の光を反射又は透過させる光学フィルタである。

【0076】

図13において、図13Aに示すように、ダイクロイックミラーDM1は、505nm未満の波長の光を反射し、505nm以上の波長の光を透過する透過特性を有する。図13Bに示すように、ダイクロイックミラーDM2は、567nm未満の波長の光を反射し、567nm以上の波長の光を透過する透過特性を有する。図13Cに示すように、ダイクロイックミラーDM3は、650nm未満の波長の光を反射し、650nm以上の波長の光を透過する透過特性を有する。

【0077】

なお、図13においては、図示を省略するが、ダイクロイックミラーDM0は、900nm未満の波長の光を反射し、900nm以上の波長の光を透過する透過特性を有する（図15参照）。ダイクロイックミラーDM0は、蛍光FL1からFL3及びLBに対して

10

20

30

40

50

は、波長選択制は不要であるため、鏡面反射する反射ミラーを用いてもよい。しかし、反射ミラーを使用すると、900 nm以上の波長域の赤外線も反射してしまう。第1検出器51から第3検出器53に赤外線が入射すると、温度上昇の原因となるため、好ましくない。そのため、反射ミラーではなく、ダイクロイックミラーDM0が使用される。

【0078】

図12Aに示すように、シャッタ57Aを通過して第1鏡胴部54に入射する励起光LBは、中心波長が476 nmなので、ダイクロイックミラーDM1で反射する。ダイクロイックミラーDM1は、励起光LBをダイクロイックミラーDM0に向けて反射する。ダイクロイックミラーDM0は、入射した励起光LBを、第2鏡胴部55の下流端に配置される対物レンズ58に向けて反射する。

10

【0079】

対物レンズ58は、装着部16に装着された流路デバイス11の検出位置46（図10参照）に励起光LBを入射させる。対物レンズ58は、第2流路26の幅W2（本例では400 nm）に、励起光LBのスポット径が収まるように励起光LBを集光する。

【0080】

第2流路26内に蛍光トレーサTR1からTR3の漏出がある場合は、検出位置46に励起光LBが照射されることにより、蛍光トレーサTR1からTR3のそれぞれから、それぞれの波長域の蛍光FL1からFL3が発光する。本例において、励起光源56は1つであり、各蛍光トレーサTR1からTR3は、1種類の励起光LBによって、それぞれ異なる波長域の蛍光FL1からFL3を発する。

20

【0081】

図14において、各蛍光トレーサTR1からTR3のそれぞれの蛍光FL1からFL3の波長域の一例を示す。図14Aに示すように、小サイズの蛍光トレーサTR1が発光する蛍光FL1は、約500 nmから約700 nmの範囲の波長域を有している。図14Bに示すように、中サイズの蛍光トレーサTR2が発光する蛍光FL2は、約570 nmから約640 nmの範囲の波長域を有している。図14Cに示すように、大サイズの蛍光トレーサTR3が発光する蛍光FL3は、約660 nmから約850 nmの範囲の波長域を有している。

【0082】

図15に示すように、ダイクロイックミラーDM1は、これらの3種類の蛍光FL1からFL3をすべて透過する。ダイクロイックミラーDM2は、3種類の蛍光FL1からFL3のうち、蛍光FL2及びFL3を透過する。ダイクロイックミラーDM3は、蛍光FL3を透過する。

30

【0083】

図12に戻って、ダイクロイックミラーDM0には、各蛍光トレーサTR1からTR3が発する蛍光FL1からFL3が入射する。また、蛍光FL1からFL3に加えて、流路デバイス11において反射して対物レンズ58に再入射する励起光LBも再入射する。

【0084】

蛍光FL1からFL3、及び励起光LBは、ダイクロイックミラーDM0で反射して、ダイクロイックミラーDM1に入射する。ダイクロイックミラーDM1は、励起光LBを反射して、蛍光FL1からFL3を透過する。本例においては、ダイクロイックミラーDM1は、2枚構成になっており、1枚目のダイクロイックミラーDM1を透過した蛍光FL1からFL3は、2枚目のダイクロイックミラーDM1も透過する。ダイクロイックミラーDM1が2枚構成になっている理由は、励起光LBとして、光強度の高いレーザ光を使用しているため、このレーザ光を確実にカットするためである。

40

【0085】

ダイクロイックミラーDM1の後段には、ダイクロイックミラーDM2が配置されている。ダイクロイックミラーDM2は、蛍光FL2及びFL3を透過する一方、蛍光FL1を、第1検出器51に向けて反射する。反射された蛍光FL1は、集光レンズ59によって集光される。集光された光束は、第1検出器51内の受光部51Aに入射する。このよ

50

うに、ダイクロイックミラーDM2によって、蛍光FL1と、蛍光FL2及びFL3とが分離される。

【0086】

ダイクロイックミラーDM2を通過した蛍光FL2及びFL3は、ダイクロイックミラーDM3に入射する。ダイクロイックミラーDM3は、蛍光FL3を透過する一方、蛍光FL2を、第2検出器52に向けて反射する。反射された蛍光FL2は、集光レンズ59によって集光される。集光された光束は、第2検出器52内の受光部52Aに入射する。このように、ダイクロイックミラーDM3によって、蛍光FL2と、蛍光FL3とが分離される。

【0087】

ダイクロイックミラーDM3を透過した蛍光FL3は、集光レンズ59によって集光される。集光された光束は、第3検出器53内の受光部53Aに入射する。

【0088】

このように、ダイクロイックミラーDM2及びDM3は、3種類の蛍光FL1からFL3をそれぞれ分離するための光学フィルタとして機能する。第1検出器51から第3検出器53の各受光部51Aから53Aは、蛍光トレーサTR1からTR3及びそれぞれに対応する蛍光FL1からFL3毎に3つ設けられている。第1検出器51から第3検出器53の各受光部51Aから53Aは、ダイクロイックミラーDM2及びDM3によって分離された3種類の蛍光FL1からFL3のそれぞれを受光する。

【0089】

第1検出器51から第3検出器53の各受光部51Aから53Aは、一例としてフォトマルチプライヤーが用いられる。フォトマルチプライヤーは、蛍光顕微鏡と比較して、感度が約100倍程度高いため、S/N(Signal/Noise)比の高い検出信号が得られる。第1検出器51から第3検出器53のそれぞれは、各蛍光FL1からFL3の光強度に応じた電圧信号(電圧[V:Volt])を検出信号として出力する。

【0090】

図16は、各検出器51から53のそれぞれが出力する、各蛍光FL1からFL3の検出信号の一例である。図16において、横軸は時間であり、図16に示すグラフは、各検出器51から53が出力する各蛍光FL1からFL3のそれぞれの検出信号の時間変化を示す。検出信号は、各蛍光FL1からFL3の光強度を表す信号である。蛍光FLの光強度は、蛍光トレーサTRの漏出量を表すものであるため、検出信号の時間変化は、蛍光トレーサTRの漏出量の時間変化を表すものである。蛍光トレーサTRの漏出量は、各蛍光トレーサTRの漏出状況の一例である。

【0091】

また、各検出器51から53は、例えば、検出信号の出力間隔を最大で約1msという短い間隔に設定することが可能である。出力間隔は、目的に応じて適宜設定される。

【0092】

図17に示すように、制御装置13を構成するコンピュータは、ストレージデバイス60、メモリ61、CPU(Central Processing Unit)62、通信部63、ディスプレイ64、および入力デバイス65を備えている。これらはデータバス66を介して相互接続されている。

【0093】

ストレージデバイス60は、制御装置13を構成するコンピュータに内蔵、またはケーブル及びネットワークなどを通じて接続されたハードディスクドライブである。もしくはストレージデバイス60は、ハードディスクドライブを複数台連装したディスクアレイである。また、ストレージデバイス60は、コンピュータの外部に配置されて、制御装置13とネットワーク接続されていてもよい。ストレージデバイス60には、オペレーティングシステム等の制御プログラム、各種アプリケーションプログラム(AP: Application Program)60A、およびこれらのプログラムに付随する各種データ等が記憶されている。

。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

メモリ 6 1 は、C P U 6 2 が処理を実行するためのワークメモリである。C P U 6 2 は、ストレージデバイス 6 0 に記憶されたプログラムをメモリ 6 1 へロードして、プログラムにしたがった処理を実行することにより、コンピュータの各部を統括的に制御する。

【 0 0 9 5 】

通信部 6 3 は、L A N (Local Area Network)、インターネット、又は公衆通信網等の W A N (Wide Area Network) といったネットワークを介した各種情報の伝送制御を行うネットワークインターフェースである。ディスプレイ 6 4 は各種画面を表示する。各種画面には G U I (Graphical User Interface) による操作機能が備えられる。制御装置 1 3 を構成するコンピュータは、各種画面を通じて、入力デバイス 6 5 からの操作指示の入力を受け付ける。入力デバイス 6 5 は、キーボード、マウス、及びタッチパネル等である。

10

【 0 0 9 6 】

A P 6 0 A には、測定装置 1 0 の作動プログラムが含まれている。作動プログラムは、コンピュータを測定装置 1 0 の制御装置 1 3 として機能させるためのプログラムである。ストレージデバイス 6 0 には、作動プログラムに加えて、作動プログラムを実行する際に必要な各種のデータが格納されている。

【 0 0 9 7 】

図 1 8 に示すように、作動プログラムが起動されると、制御装置 1 3 を構成するコンピュータの C P U 6 2 は、メモリ 6 1 等と協働して、検出制御部 6 2 1、データ処理部 6 2 2、及び出力制御部 6 2 3 として機能する。また、データ処理部 6 2 2 は、信号処理部 6 2 2 A、濃度導出部 6 2 2 B、及び欠陥状態導出部 6 2 2 C として機能する。

20

【 0 0 9 8 】

検出制御部 6 2 1 は、検出部 1 7 に対して制御信号を送信することで、検出部 1 7 の各部、具体的には、励起光源 5 6、シャッタ部 5 7、第 1 検出器 5 1 から第 3 検出器 5 3 のそれぞれの動作を制御する。また、検出制御部 6 2 1 は、各検出器 5 1 から 5 3 の検出信号を取得して、取得した検出信号をデータ処理部 6 2 2 に出力する。検出制御部 6 2 1 は、検出部 1 7 からの検出信号を取得する取得部として機能する。

【 0 0 9 9 】

データ処理部 6 2 2 は、各検出部 1 7 が出力する検出信号に対して、データ処理を施す。データ処理部 6 2 2 において、検出制御部 6 2 1 から出力される検出信号は、信号処理部 6 2 2 A に入力される。

30

【 0 1 0 0 】

信号処理部 6 2 2 A は、検出信号に対して信号処理を施す。信号処理には、補正処理、オーバーラップ部分を除去する除去処理、及び変換処理などが含まれる。補正処理は、受光部 5 1 A から 5 3 A のそれぞれの暗電流の補正処理などが含まれる。

【 0 1 0 1 】

オーバーラップ部分の除去処理は、複数種類の光の波長域がオーバーラップする部分を、それぞれの光に対応する検出信号から除去する処理である。本例においては、複数種類の蛍光 F L 1 から F L 3 の波長域がオーバーラップする部分を、各蛍光 F L 1 から F L 3 に対応する検出信号から除去する。図 1 5 においてハッチングで示したように、蛍光 F L 1 の波長域の一部は、蛍光 F L 2 及び F L 3 のそれぞれの波長域と一部オーバーラップしている。そのため、蛍光 F L 2 及び F L 3 に対応するそれぞれの検出信号には、蛍光 F L 1 のオーバーラップ部分が含まれている。除去処理においては、蛍光 F L 2 及び F L 3 の検出信号から、蛍光 F L 1 のオーバーラップ部分が除去される。

40

【 0 1 0 2 】

例えば、蛍光 F L 2 及び F L 3 に対応する第 2 検出器 5 2 及び第 3 検出器 5 3 に対して、蛍光 F L 1 が入射する入射光量と、蛍光 F L 1 が第 1 検出器 5 1 に入射する入射光量との対応関係が予め測定される。信号処理部 6 2 2 A は、この対応関係に基づいて、第 1 検出器 5 1 が出力する検出信号の値に応じて、オーバーラップ部分を算出する。そして、算出したオーバーラップ部分を、第 2 検出器 5 2 及び第 3 検出器 5 3 の検出信号から除去す

50

る。

【 0 1 0 3 】

また、変換処理は、電圧値を表す検出信号を、光強度を表す検出信号である光強度データに変換する処理である。

【 0 1 0 4 】

図 1 9 において、こうした信号処理部 6 2 2 A の処理の概要を示す。信号処理部 6 2 2 A は、上述のとおり、暗電流補正等の補正処理（補正）、オーバーラップ部分の除去処理（オーバーラップ部分除去）、変換処理（変換）の各処理を実行する。変換処理によって、電圧値の時間変化が、光強度の時間変化に変換される。信号処理部 6 2 2 A は、光強度データを濃度導出部 6 2 2 B に出力する。

10

【 0 1 0 5 】

図 2 0 に示すように、濃度導出部 6 2 2 B は、信号処理部 6 2 2 A から、光強度データを取得する。濃度導出部 6 2 2 B は、検出信号としての光強度データに基づいて、第 1 流路 2 5 から第 2 流路 2 6 に漏出した複数種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度を導出する。

【 0 1 0 6 】

濃度導出には、検量線 C R が用いられる。ストレージデバイス 6 0 内には各種データとして、検量線 C R が格納されている。検量線 C R は、評価液 2 1 に含まれる各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度と、各蛍光 F L 1 から F L 3 のそれぞれの光強度との関係を示す。濃度は、第 1 流路 2 5 に供給される評価液 2 1 に含まれる各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度を 1 0 0 とした場合の濃度である。各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の第 1 流路 2 5 から第 2 流路 2 6 への漏出が多いほど、濃度は高い。こうした検量線 C R は、予め測定され、測定されたデータが、ストレージデバイス 6 0 内に格納される。

20

【 0 1 0 7 】

濃度導出部 6 2 2 B は、光強度データ及び検量線 C R を用いて、図 2 0 に一例として示すように、蛍光トレーサ T R 1 の濃度は 1 5 %、蛍光トレーサ T R 2 の濃度は 1 0 %、蛍光トレーサ T R 3 の濃度は 5 % といった濃度を導出する。検量線 C R は、テーブルとして格納されていてもよいし、関数として格納されていてもよい。濃度導出部 6 2 2 B は、導出した濃度を欠陥状態導出部 6 2 2 C に出力する。

30

【 0 1 0 8 】

図 1 8 において、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、濃度導出部 6 2 2 B が導出した、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の濃度に基づいて、細胞シート 2 0 に生じている欠陥の状態を導出する。

【 0 1 0 9 】

図 2 1 は、蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のサイズと、細胞シート 2 0 に生じる欠陥 D F のサイズ毎の透過の可否との関係を示す。小サイズの蛍光トレーサ T R 1 は、図 9 で示した、小サイズの欠陥 D F 1、中サイズの欠陥 D F 2、及び大サイズの欠陥 D F 3 のすべての欠陥 D F を透過可能である。中サイズの蛍光トレーサ T R 2 は、小サイズの欠陥 D F 1 を透過することできないが、中サイズの欠陥 D F 2 及び大サイズの欠陥 D F 3 を透過可能である。大サイズの蛍光トレーサ T R 3 は、小サイズの欠陥 D F 1 及び中サイズの欠陥 D F 2 を透過することはできず、大サイズの欠陥 D F 3 のみ透過可能である。

40

【 0 1 1 0 】

このように、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 は、小サイズ、中サイズ及び大サイズのすべてのサイズの欠陥 D F 1 から D F 3 を透過可能であり、また、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 は、中サイズ及び大サイズの欠陥 D F 2 及び D F 3 を透過可能である。このため、各サイズの蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の濃度だけでは、細胞シート 2 0 に生じる欠陥状態、例えば、サイズが異なる複数種類の欠陥 D F 1 から D F 3 のおおよその割合などを把握することができない。つまり、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 は、小サイズの欠陥 D F 1 だけでなく、中サイズの欠陥 D F 2 及び大サイズの欠陥 D F 3 を透過するため、蛍光

50

トレーサ T R 1 の濃度が、小サイズの欠陥 D F 1 の面積にのみ依存しているわけではないからである。

【 0 1 1 1 】

そこで、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、次のような手順で欠陥状態を導出する。まず、図 2 2 に示すように、細胞シート 2 0 上の欠陥 D F の総面積と、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの漏出量の指標である濃度との関係 G を予め測定する。関係 G は、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 を 1 種類ずつ、評価液 2 1 に含有させた状態で測定される。図 9 に示したように、欠陥 D F のサイズは種々のサイズが考えられるが、関係 G における欠陥 D F の総面積は、例えば、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれが透過可能なサイズの欠陥 D F の総面積である。

10

【 0 1 1 2 】

すなわち、図 2 2 に示す関係 G は、細胞シート 2 0 に生じる欠陥 D F の総面積がどの程度のときに、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 がそれぞれどの程度、第 2 流路 2 6 に漏出するかを表す。この関係 G を示すデータは、関数又はテーブルの形態で、ストレージデバイス 6 0 内に格納される。

【 0 1 1 3 】

図 2 3 及び図 2 4 に示すように、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、濃度導出部 6 2 2 B が導出した濃度の測定値と、関係 G とを用いて、欠陥状態導出処理を実行する。

【 0 1 1 4 】

図 2 4 に示すように、欠陥状態導出処理において、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、まず、第 1 処理を実行する。第 1 処理は、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度から、個別に欠陥 D F の仮総面積を導出する処理である。第 1 処理において、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度に基づいて、関係 G を参照して、濃度に対応する総面積を求める。この総面積を仮総面積とする。

20

【 0 1 1 5 】

図 2 4 において一例として示すように、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 の濃度が 1 5 % の場合は、細胞シート 2 0 の欠陥 D F の仮総面積は、1 0 0 0 である。そして、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 の濃度が 1 0 % の場合は、欠陥 D F の仮総面積は、7 0 0 であり、大サイズの蛍光トレーサ T R 3 の濃度が 5 % の場合は、欠陥 D F の仮総面積は、2 0 0 である。なお、図 2 4 において、仮総面積は、一例として規格化された値であり、単位は無い。

30

【 0 1 1 6 】

欠陥状態導出部 6 2 2 C は、第 1 処理の後、第 2 処理を実行する。第 2 処理は、仮総面積から、サイズ毎の欠陥 D F 1 から D F 3 の面積を導出する。欠陥状態導出部 6 2 2 C は、サイズが異なる欠陥 D F 1 から D F 3 のうち、大きい方から順に面積を求める。まず、図 2 1 に示したとおり、大サイズの蛍光トレーサ T R 3 は、大サイズの欠陥 D F 3 しか透過しない。そのため、大サイズの蛍光トレーサ T R 3 に基づいて求めた、欠陥 D F の仮総面積の 2 0 0 は、大サイズの欠陥 D F 3 のみの総面積と考えられる。そのため、大サイズの蛍光トレーサ T R 3 に基づいて求めた仮総面積の 2 0 0 は、そのまま大サイズの欠陥 D F 3 の面積として求められる。

40

【 0 1 1 7 】

次に、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、中サイズの欠陥 D F 2 の面積を求める。中サイズの蛍光トレーサ T R 2 は、中サイズの欠陥 D F 2 に加えて、大サイズの欠陥 D F 3 も透過する。そのため、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 に基づいて求めた、欠陥 D F の仮総面積の 7 0 0 には、大サイズの欠陥 D F 3 の面積が含まれていると考えられる。そのため、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 に基づいて求めた、仮総面積の 7 0 0 から、大サイズの欠陥 D F 3 の面積である 2 0 0 を控除する。欠陥状態導出部 6 2 2 C は、これにより求めた 5 0 0 という値を、中サイズの欠陥 D F 2 の面積とする。

【 0 1 1 8 】

最後に、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、小サイズの欠陥 D F 1 の面積を求める。小サイズ

50

の蛍光トレーサ T R 1 は、小サイズの欠陥 D F 1 に加えて、中サイズ及び大サイズの欠陥 D F 2 及び D F 3 も透過する。そのため、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 に基づいて求めた、欠陥 D F の仮総面積の 1 0 0 0 には、中サイズの欠陥 D F 2 の面積及び大サイズの欠陥 D F 3 の面積が含まれていると考えられる。そのため、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 に基づいて求めた、仮総面積 1 0 0 0 から、中サイズの欠陥 D F 2 の面積である 5 0 0 と、大サイズの欠陥 D F 3 の面積である 2 0 0 とを控除する。欠陥状態導出部 6 2 2 C は、これにより求めた 3 0 0 という値を、小サイズの欠陥 D F 1 の面積とする。

【 0 1 1 9 】

欠陥状態導出部 6 2 2 C は、このように、サイズが異なる蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度と、関係 G とに基づいて、細胞シート 2 0 に生じたサイズが異なる欠陥 D F 1 から D F 3 のおよその割合を、欠陥状態として導出する。

10

【 0 1 2 0 】

図 2 5 に示す測定結果表示画面 6 9 は、ディスプレイ 6 4 に表示される画面の一例である。図 1 8 に示す出力制御部 6 2 3 は、こうした測定結果表示画面 6 9 を生成し、測定結果表示画面 6 9 の内容をリアルタイムで更新する。図 1 8 に示したように、出力制御部 6 2 3 には、信号処理部 6 2 2 A が処理した光強度データ、濃度導出部 6 2 2 B が導出した濃度、及び欠陥状態導出部 6 2 2 C が導出した欠陥状態といった測定データが入力される。こうした測定データは、蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の漏出状況を表すものであり、細胞シート 2 0 のバリア性を評価するための指標となる。

【 0 1 2 1 】

20

出力制御部 6 2 3 は、測定結果表示画面 6 9 にこうした測定データを測定結果として表示する。光強度データ、濃度、及び欠陥状態といった測定データは、リアルタイムで取得される検出信号に基づいて更新される。出力制御部 6 2 3 は、測定データをリアルタイムで表示する。これにより、蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の漏出状況がリアルタイムでディスプレイ 6 4 に出力される。出力制御部 6 2 3 は、漏出状況を出力する出力制御処理を実行する処理部として機能する。

【 0 1 2 2 】

以下、上記構成による作用について、図 2 6 に示すフローチャートを参照しながら説明する。本例において、測定装置 1 0 のユーザは、流路デバイス 1 1 の製造メーカーである。ユーザは、製造した流路デバイス 1 1 の細胞シート 2 0 のバリア性を評価する場合に、測定装置 1 0 を用いる。

30

【 0 1 2 3 】

まず、ステップ S 1 1 0 0 において、流路デバイス 1 1 は、測定装置 1 0 にセットされる。具体的には、流路デバイス 1 1 は、装着部 1 6 に装着される。そして、図 1 に示すように、流路デバイス 1 1 に対して、供給チューブ 2 2 A 及び排出チューブ 2 2 B が取り付けられる。さらに、3種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 が混在した評価液 2 1 が予め調整され、調整された評価液 2 1 がポンプ 2 2 C のタンクにセットされる。

【 0 1 2 4 】

ステップ S 1 2 0 0 において、測定開始ボタンなどの操作指示により、測定開始指示が入力されると、測定装置 1 0 は測定を開始する。具体的には、検出制御部 6 2 1 は、検出部 1 7 の励起光源 5 6 及び第 1 検出器 5 1 から第 3 検出器 5 3 等の各部の動作を開始させる。これにより、第 1 検出器 5 1 から第 3 検出器 5 3 のそれぞれから検出信号の出力が開始される。

40

【 0 1 2 5 】

ステップ S 1 3 0 0 において、ポンプ 2 2 C の動作が開始されると、複数種類のトレーサとして、3種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 が混在した評価液 2 1 が流路デバイス 1 1 に供給される。これにより、評価液 2 1 の第 1 流路 2 5 への送液が開始される。

【 0 1 2 6 】

ステップ S 1 4 0 0 において、検出部 1 7 の第 1 検出器 5 1 から第 3 検出器 5 3 は、それぞれ検出信号を出力する。細胞シート 2 0 に欠陥 D F が生じていない場合は、第 2 流路

50

26への蛍光トレーサTRの漏出はない。この場合、第1検出器51から第3検出器53は、ベースラインを示す検出信号を出力する。

【0127】

一方、細胞シート20に欠陥DFが生じている場合は、評価液21に混在する3種類の蛍光トレーサTR1からTR3のうちの少なくとも1種類が、欠陥DFを透過して、第1流路25から第2流路26に漏出する。検出部17からは、第2流路26の検出位置46に励起光LBが照射されている。励起光LBは、第2流路26に蛍光トレーサTR1からTR3が漏出されると、蛍光トレーサTR1からTR3に励起光LBが照射されることにより、蛍光トレーサTR1からTR3の各蛍光FL1からFL3を発する。検出部17の第1鏡胴部54内のダイクロイックミラーDM1からDM3によって、各蛍光FL1からFL3は、光学的に分離されて、第1検出器51から第3検出器53のそれぞれに入射する。

10

【0128】

第1検出器51から第3検出器53は、3種類の蛍光トレーサTR1からTR3のそれぞれに対応する蛍光FL1からFL3のそれぞれの光強度に応じて、漏出した蛍光トレーサTR毎の検出信号を出力する。すなわち、各蛍光FL1からFL3のそれぞれの光強度は、蛍光トレーサTR1からTR3のそれぞれの漏出状況を表している。すなわち、検出部17は、各蛍光FL1からFL3の光強度を区別して検出することにより、各蛍光トレーサTR1からTR3の漏出状況を光学的に区別して検出する。検出制御部621は、検出部17から、検出信号を取得し、データ処理部622に出力する。

20

【0129】

ステップS1500において、データ処理部622は、検出信号に対してデータ処理を施す。信号処理部622Aは、図19に示すように、検出信号に対して、補正処理、オーバーラップ除去処理、及び変換処理などを実行する。濃度導出部622Bは、信号処理が施された光強度データに対して、図20に示す濃度導出処理を実行して、濃度を導出する。欠陥状態導出部622Cは、濃度導出部622Bが導出した濃度に基づいて、図23及び図24に示す欠陥状態導出処理を実行して、欠陥状態を導出する。

【0130】

ステップS1600において、出力制御部623は、データ処理部622によって処理された測定データを測定結果として測定結果表示画面69を生成し、測定結果をディスプレイ64にリアルタイムで表示する。ユーザは、測定結果表示画面69の測定結果に基づいて、各蛍光トレーサTR1からTR3の漏出の有無、漏出量及び漏出量の時間変化などを含む漏出状況、さらには、細胞シート20の欠陥状態を確認することができる。こうした測定結果は、細胞シート20のバリア性を評価するための指標であるので、ユーザは、こうした測定結果に基づいて細胞シート20のバリア性を評価する。

30

【0131】

ステップS1700において、予め設定された時間が未経過の場合は(S1700でN)、ステップS1400からS1600の測定処理が継続される。ステップS1700において、予め設定された時間が経過した場合は(S1700でY)、ステップS1800に進む。ステップS1800において、評価液の送液、検出部17の動作が停止されることにより、測定が終了される。

40

【0132】

本開示の技術に係る測定装置10は、サイズが異なる複数種類のトレーサとして、3種類の蛍光トレーサTR1からTR3が混在する評価液21が、第1流路25に送液された場合において、細胞シート20に生じる欠陥DFを通じて第1流路25から第2流路26に漏出する複数の蛍光トレーサTR1からTR3のそれぞれの漏出状況を光学的に区別して検出する検出部17を有している。そのため、従来と比べて、時間と手間をかけることなく、細胞シート20に生じるサイズが異なる複数種類の欠陥DFを検出することができる。

【0133】

50

このような本開示の技術に係る測定装置 10 の効果について、図 27 に示す比較例を用いてより詳細に説明する。図 27 に示す比較例は、3 種類の蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 を用いる点は、測定装置 10 と同様である。相違点は、これらの各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 を混在させた評価液 21 を用いずに、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 を 1 種類ずつ使用して測定を行う点である。

【0134】

より詳しくは、比較例は、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 のみを含む第 1 評価液、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 のみを含む第 2 評価液、及び大サイズの蛍光トレーサ T R 3 のみを含む第 3 評価液の 3 種類の評価液を使用する。そして、比較例では、これらの第 1 評価液から第 3 評価液を入れ替えながら 3 回に分けて測定を行う。

10

【0135】

すなわち、まず、ステップ S 2100 において、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 のみを含む第 1 評価液を使用して第 1 測定を行う。第 1 測定を行うことにより、小サイズの蛍光トレーサ T R 1 の漏出状況が検出される。

【0136】

次の測定を行う前に、ステップ S 2200 において、第 1 流路 25 にバッファを流して、第 1 流路 25 を洗浄する。

【0137】

ステップ S 2300 において、中サイズの蛍光トレーサ T R 2 のみを含む第 2 評価液を使用して第 2 測定を行う。第 2 測定を行うことにより、中サイズの蛍光 F L 2 の漏出状況が検出される。

20

【0138】

次の測定を行う前に、ステップ S 2400 において、第 1 流路 25 にバッファを流して、第 1 流路 25 を洗浄する。

【0139】

最後に、ステップ S 2500 において、大サイズの蛍光トレーサ T R 3 のみを含む第 3 評価液を使用して第 3 測定を行う。第 3 測定を行うことにより、大サイズの蛍光 F L 3 の漏出状況が検出される。

【0140】

比較例のように 3 種類の評価液を入れ替えながら使い分ける方法によっても、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の漏出状況を検出することができる。

30

【0141】

しかしながら、比較例においては、3 種類の評価液を入れ替えながら、3 回の測定を行う必要があるため、本開示の技術に係る測定装置 10 及び測定方法と比較して、時間と手間が掛る。また、比較例では、3 種類の評価液を入れ替えながら、3 回の測定を行うため、各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の漏出状況を、同一の条件で検出することが困難である。というのも、評価液を送液する度に、細胞シート 20 には少なからずダメージが生じてしまう。このダメージにより、各測定において、細胞シート 20 の欠陥状態が変化してしまうからである。

【0142】

40

さらに、比較例のように、異なる種類の評価液を入れ替える場合には、評価液を入れ替える度に、第 1 流路 25 の洗浄が必要となる。洗浄においても、細胞シート 20 とバッファが接触するため、洗浄によっても細胞シート 20 に対してダメージが生じる。また、洗浄が必要になる分、さらに、時間と手間も増加する。

【0143】

本開示の技術に係る測定装置 10 は、複数種類のトレーサが混在する評価液を用いて、1 回の測定で各トレーサの漏出状況を検出する。そのため、時間と手間を軽減できるばかりでなく、比較例と比べて、各トレーサの漏出状況を同一の条件で検出することができるという効果が得られる。

【0144】

50

また、複数種類のトレーサとして、波長域が異なる蛍光を発する蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 を使用している。蛍光トレーサ T R は、サイズ及び蛍光の色などの種類も豊富であるため、適切なトレーサを選択しやすい。

【 0 1 4 5 】

また、蛍光を検出する検出部 1 7 は、励起光源 5 6 と、複数種類の蛍光 F L 1 から F L 3 を分離するための光学フィルタとしてのダイクロイックミラー D M 1 から D M 3 と、各ダイクロイックミラー D M 1 から D M 3 で分離された蛍光 F L 1 から F L 3 を受光する受光部 5 1 A から受光部 5 3 A とを有する。こうした蛍光を検出する構成は、一般的なので、検出部 1 7 を簡単に製造しやすい。

【 0 1 4 6 】

また、測定装置 1 0 は、励起光源 5 6 として、レーザ光源を使用しているため、光強度が強い蛍光 F L 1 から F L 3 を検出することができる。このため、検出信号の S / N 比が向上する。また、第 1 検出器 5 1 から第 3 検出器 5 3 として、フォトマルチプライヤーを使用している。このため、蛍光顕微鏡と比較して検出信号の S / N 比が向上する。

【 0 1 4 7 】

また、測定装置 1 0 は、励起光源 5 6 が 1 つであり、3 種類の蛍光 F L 1 から F L 3 毎に受光部 5 1 A から受光部 5 3 A の 3 つの受光部が設けられている。励起光源 5 6 を 1 つにすることで、複数の励起光源 5 6 を設ける場合と比べて、構成の簡略化、小型化、及び製造コストの低減が可能となる。また、3 つの受光部が設けられているため、例えば、各蛍光 F L 1 から F L 3 の波長域に合わせた調整がしやすい。

【 0 1 4 8 】

また、本開示の技術に係る測定装置 1 0 は、装着部 1 6 に装着された流路デバイス 1 1 において、検出位置 4 6 に励起光 L B を照射する。検出位置 4 6 は、スリット 3 4 A に対応する連通部分から漏出するトレーサの一例である蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の流れ方向の下流側であって、第 1 流路 2 5 及び第 2 流路 2 6 のうち、第 2 流路 2 6 にのみ入射する位置の一例である。第 1 流路 2 5 には励起光 L B が入射しないため、第 2 流路 2 6 に漏出したトレーサのみを確実に検出することができる。

【 0 1 4 9 】

本開示の技術に係る測定装置 1 0 が検出する漏出状況には、トレーサの一例である蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 の漏出量の時間変化も含まれる。そのため、細胞シート 2 0 の欠陥状態の時間変化を観察することができる。

【 0 1 5 0 】

また、本開示の技術に係る測定装置 1 0 は、検出部 1 7 が出力する検出信号に対して、データ処理を施すデータ処理部 6 2 2 を備えている。これにより、電圧値を表す検出信号を光強度データに変換するなど、観察に適した形態に加工することができる。また、データ処理部 6 2 2 によって、濃度及び欠陥状態など、種々の測定結果を得ることができる。

【 0 1 5 1 】

また、測定装置 1 0 において、信号処理部 6 2 2 A は、検出信号に対する補正処理、複数種類の光としての蛍光 F L 1 から F L 3 の波長域がオーバーラップする部分を、検出信号から除去する除去処理を実行するので、より精度の高い検出信号が得られる。

【 0 1 5 2 】

例えば、図 1 9 において上段に示すグラフは、オーバーラップ部分の除去処理が実行される前の電圧値の時間変化を示すグラフである。また、図 1 9 において下段に示すグラフは、オーバーラップ部分の除去処理が実行された後の光強度の時間変化を示すグラフである。上段のグラフにおいては、蛍光 F L 1 から蛍光 F L 3 の 3 種類の蛍光 F L がすべて単調に増加しているように見える。

【 0 1 5 3 】

しかしながら、図 1 9 において下段に示すグラフでは、蛍光 F L 1 の光強度は単調に増加していない。具体的には、蛍光 F L 1 の光強度は、最初は増加しているが、ピークに達した後、低下している。このように、オーバーラップ部分の除去処理を施すことで、蛍光

10

20

30

40

50

トレーサ T R の漏出状況を表す各検出信号の正確な時間変化を把握することができる。

【 0 1 5 4 】

また、測定装置 1 0 において、濃度導出部 6 2 2 B は、複数種類のトレーサの一例である各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度を導出する。そのため、蛍光トレーサ T R の漏出状況を電圧値で表示する場合と比べて、濃度で示すことにより、漏出状況を直感的に把握しやすい。

【 0 1 5 5 】

測定装置 1 0 において、欠陥状態導出部 6 2 2 C は、複数種類のトレーサの一例である各蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの濃度に基づいて、細胞シート 2 0 に生じている欠陥 D F の状態である欠陥状態を導出する。欠陥状態には、例えば、サイズが異なる複数種類の欠陥 D F 1 から D F 3 のそれぞれのおおよその割合などが含まれる。こうした欠陥状態を導出することにより、単に欠陥 D F の有無を検出する場合と比べて、細胞シート 2 0 のバリア性を詳細に評価することができる。

10

【 0 1 5 6 】

測定装置 1 0 において、出力制御部 6 2 3 は、検出部 1 7 によって検出された、トレーサの一例である蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれの漏出状況を、リアルタイムでディスプレイ 6 4 に表示する。これにより、蛍光トレーサ T R の漏出状況の時間変化、及び細胞シート 2 0 の欠陥状態の時間変化をリアルタイムで観察することができる。

【 0 1 5 7 】

また、流路デバイス 1 1 において、細胞シート 2 0 の支持体として機能する透過膜 3 6 は、直径が $1\ \mu\text{m}$ 以上の孔を有する。従来の特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 号公報においては、細胞シート 2 0 の支持体としてはゲルが用いられている。ゲルは $1\ \mu\text{m}$ 以上の大サイズのトレーサを透過しにくい。そのため、透過膜 3 6 を使用することにより、細胞シート 2 0 に生じる $1\ \mu\text{m}$ 以上の大サイズの欠陥 D F を検出することができる。

20

【 0 1 5 8 】

なお、細胞シート 2 0 の支持体として、透過膜 3 6 の代わりにゲルを用いてもよい。細胞シート 2 0 の支持体としてゲルを用いる場合は、ゲルの性質に応じてトレーサのサイズを選択すればよい。しかし、透過膜 3 6 には上述のメリットがあるため、透過膜 3 6 を使用することが好ましい。

【 0 1 5 9 】

また、複数種類のトレーサの一例である蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 のそれぞれのサイズ（粒径）は、 $1\ \text{nm}$ 以上 $100\ \mu\text{m}$ 以下の範囲に含まれる。これにより、細胞シート 2 0 の様々なサイズの欠陥 D F を検出することができる。

30

【 0 1 6 0 】

複数種類のトレーサの一例である蛍光トレーサ T R 1 から T R 3 は、 $1\ \text{nm}$ から数百 nm のオーダのサイズ（粒径）のトレーサと、 $1\ \mu\text{m}$ から数十 μm のオーダのサイズ（粒径）のトレーサとを含む。サイズが異なる欠陥 D F の検出を目的とした場合、サイズに大差の無い複数種類のトレーサを使用するメリットは少ない。オーダが異なる程、サイズ（粒径）に大きな違いがあるトレーサを使用することで、サイズが異なる欠陥 D F の検出を効率的に行うことができる。

40

【 0 1 6 1 】

測定装置 1 0 は、評価液 2 1 を第 1 流路 2 5 に供給する供給機構 2 2 を備えている。そのため、供給機構を別に用意する場合と比べて、評価液 2 1 の送液がしやすい。なお、測定装置 1 0 には、供給機構 2 2 が設けられていなくてもよい。シリンジ及びピペットなどで供給機構 2 2 を代用することも可能である。

【 0 1 6 2 】

（変形例 1：透過膜の両面に細胞シートを形成）

図 8 及び図 9 に示すように、上記例の流路デバイス 1 1 においては、透過膜 3 6 の片面、すなわち、第 1 流路 2 5 側の面にのみ、細胞シート 2 0 を形成した例で説明した。図 2 8 及び図 2 9 に示すように、透過膜 3 6 のもう 1 つの面、すなわち、第 2 流路 2 6 側の面

50

にも、細胞シート 80 を形成してもよい。つまり、図 28 及び図 29 に示す例は、透過膜 36 の両面に細胞シートを形成する例である。

【0163】

細胞シート 80 は、例えば、細胞 80A が配列されたものであり、細胞 80A は、平滑筋細胞 (SMC: Smooth Muscle Cell) である。血管の内壁を構成する組織は、基底膜の一方の面に形成される内皮細胞と、他方の面に形成される平滑筋細胞とを含む。そのため、流路デバイス 11 を用いて血管をシミュレートする場合は、図 28 及び図 29 に示すように、透過膜 36 を基底膜と見立てて、透過膜 36 の一方の面に細胞シート 20 を形成し、他方の面に細胞シート 80 を形成することで、より実際の血管の組織の構成に近づけることができる。

10

【0164】

平滑筋細胞である細胞 80A は、内皮細胞である細胞 20A と異なり、密着結合が無い。そのため、図 29 に示すように、細胞シート 80 は、複数の細胞 80A が配列された状態でも、小サイズの蛍光トレーサ TR1 であれば、細胞 80A の隙間を透過することができる。また、細胞シート 80 は、細胞シート 20 と比較して、剥離もしやすい。

【0165】

(変形例 2: 回転フィルタ)

上記例では、各蛍光トレーサ TR1 から TR3 の各蛍光 FL1 から FL3 に対応して複数の第 1 検出器 51 から第 3 検出器 53 を設けた例で説明した。しかし、図 30 及び図 31 に示すように、回転フィルタ 92 を用いることで、1 つの検出器 91 で 3 種類の蛍光 FL1 から FL3 を検出することが可能である。

20

【0166】

回転フィルタ 92 には、透過特性が異なる光学フィルタとして、複数種類のダイクロイックミラー DM21 から DM23 が設けられている。回転フィルタ 92 は、例えば、図示しないモータの駆動によって回転する。この回転により、各ダイクロイックミラー DM21 から DM23 は、蛍光 FL1 から FL3 の光路内に選択的に挿入される。

【0167】

図 31 において、図 31A に示すように、ダイクロイックミラー DM21 は、蛍光 FL1 の波長域のみを透過する透過特性を有するバンドパスフィルタである。図 31B に示すように、ダイクロイックミラー DM22 は、蛍光 FL2 の波長域のみを透過する透過特性を有するバンドパスフィルタである。図 31C に示すように、ダイクロイックミラー DM23 は、蛍光 FL3 の波長域のみを透過する透過特性を有するバンドパスフィルタである。

30

【0168】

上記例において示した蛍光の波長域と蛍光トレーサのサイズとの組み合わせは一例であり、これらの組み合わせは適宜選択される。例えば、蛍光トレーサのサイズは、細胞シートに生じる欠陥 DF のサイズなど、欠陥 DF の特性等に応じて選択される。また、蛍光の波長域も、検出部 17 の光学フィルタ及び検出器の受光部などの特性に応じて適宜選択される。

【0169】

複数種類のトレーサとして、3 種類の蛍光トレーサ TR を使用した例で説明したが、トレーサの数は 3 種類に限定されず、2 種類でもよいし、4 種類以上でもよい。

40

【0170】

また、上記例において、トレーサの一例として蛍光トレーサを使用し、蛍光トレーサが発する蛍光を利用して、各トレーサの漏出状況を光学的に区別する例で説明したが、蛍光の代わりに、ラマン散乱光を利用してもよい。光を物質に照射すると、光が物質と相互作用することで入射光と異なる波長を持つラマン散乱光と呼ばれる光がでる。ラマン散乱光は、物質固有のスペクトルを持つ光である。ラマン散乱光を利用する場合は、複数種類のトレーサとして、異なるスペクトルのラマン散乱光を発する、サイズ違いの複数種類のトレーサを使用する。そして、このような複数種類のトレーサがそれぞれ発するラマン散乱光に基づいて、各トレーサの漏出状況が光学的に区別される。

50

【 0 1 7 1 】

なお、このようなラマン散乱光は非常に微弱であり、蛍光を検出する検出部 1 7 の構成と比較して、装置構成も複雑になる。そのため、測定装置 1 0 は、蛍光を利用することが好ましい。

【 0 1 7 2 】

上記各実施形態において、例えば、検出制御部 6 2 1 及びデータ処理部 6 2 2 といった各種の処理を実行する処理部 (Processing Unit) のハードウェア的な構造としては、次に示す各種のプロセッサ (Processor) を用いることができる。各種のプロセッサには、ソフトウェアを実行して各種の処理部として機能する汎用的なプロセッサである CPU (Central Processing Unit) に加えて、 F P G A (Field Programmable Gate Array) 等の製造後に回路構成を変更可能なプロセッサであるプログラマブルロジックデバイス (Programmable Logic Device : P L D) 、及び / 又は A S I C (Application Specific Integrated Circuit) 等の特定の処理を実行させるために専用に設計された回路構成を有するプロセッサである専用電気回路等が含まれる。

10

【 0 1 7 3 】

1 つの処理部は、これらの各種のプロセッサのうちの 1 つで構成されてもよいし、同種または異種の 2 つ以上のプロセッサの組み合わせ (例えば、複数の F P G A の組み合わせ、及び / 又は、 CPU と F P G A との組み合わせ) で構成されてもよい。また、複数の処理部を 1 つのプロセッサで構成してもよい。

【 0 1 7 4 】

複数の処理部を 1 つのプロセッサで構成する例としては、 1 つ以上の CPU とソフトウェアの組み合わせで 1 つのプロセッサを構成し、このプロセッサが複数の処理部として機能する形態がある。第 2 に、システムオンチップ (System On Chip : S o C) 等に代表されるように、複数の処理部を含むシステム全体の機能を 1 つの IC (Integrated Circuit) チップで実現するプロセッサを使用する形態がある。このように、各種の処理部は、ハードウェア的な構造として、上記各種のプロセッサの 1 つ以上を用いて構成される。

20

【 0 1 7 5 】

さらに、これらの各種のプロセッサのハードウェア的な構造としては、より具体的には、半導体素子等の回路素子を組み合わせた電気回路 (circuitry) を用いることができる。

【 0 1 7 6 】

また、本開示の技術は、測定装置の作動プログラムに加えて、測定装置の作動プログラムを非一時的に記憶するコンピュータで読み取り可能な記憶媒体 (U S B (Universal Serial Bus) メモリ又は D V D (Digital Versatile Disc) - R O M (Read Only Memory) など) にもおよぶ。

30

【 0 1 7 7 】

本明細書において、「 A 及び / 又は B 」は、「 A 及び B のうちの少なくとも 1 つ」と同義である。つまり、「 A 及び / 又は B 」は、 A だけであってもよいし、 B だけであってもよいし、 A 及び B の組み合わせであってもよい、という意味である。また、本明細書において、 3 つ以上の事柄を「及び / 又は」で結び付けて表現する場合も、「 A 及び / 又は B 」と同様の考え方が適用される。

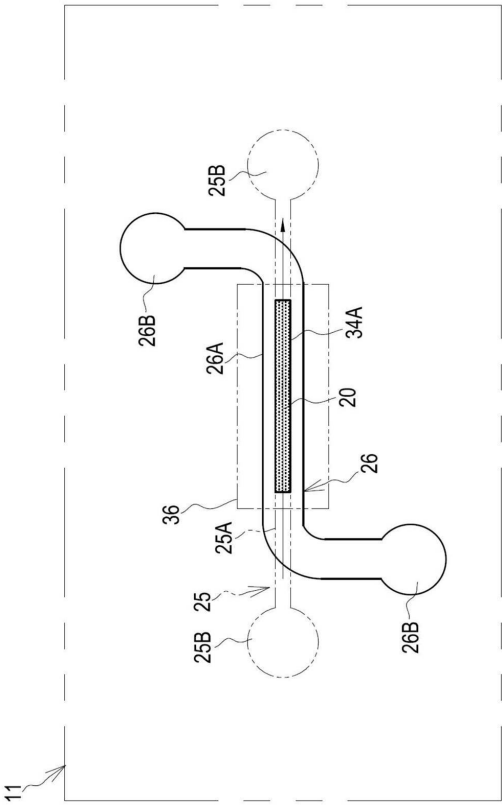
40

【 0 1 7 8 】

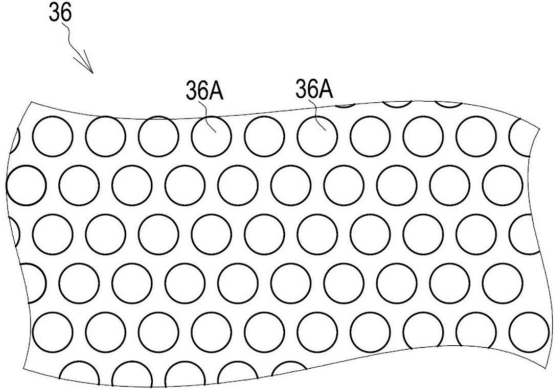
以上に示した記載内容および図示内容は、本開示の技術に係る部分についての詳細な説明であり、本開示の技術の一例に過ぎない。例えば、上記の構成、機能、作用、および効果に関する説明は、本開示の技術に係る部分の構成、機能、作用、および効果の一例に関する説明である。よって、本開示の技術の主旨を逸脱しない範囲内において、以上に示した記載内容および図示内容に対して、不要な部分を削除したり、新たな要素を追加したり、置き換えたりしてもよいことはいうまでもない。また、錯綜を回避し、本開示の技術に係る部分の理解を容易にするために、以上に示した記載内容および図示内容では、本開示の技術の実施を可能にする上で特に説明を要しない技術常識等に関する説明は省略されている。

50

【図 5】



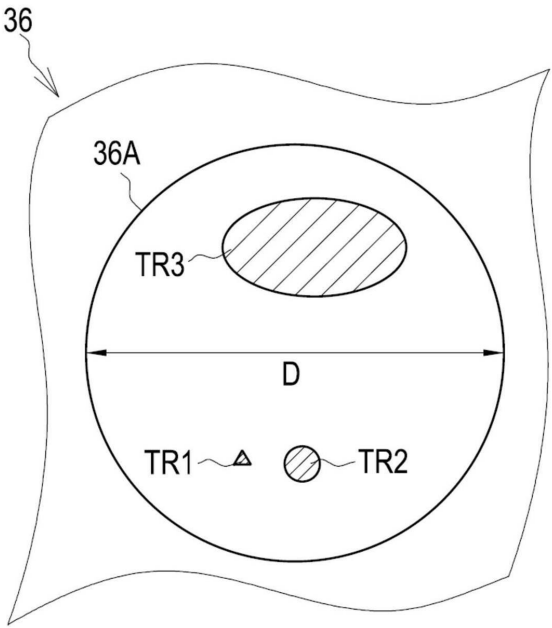
【図 6】



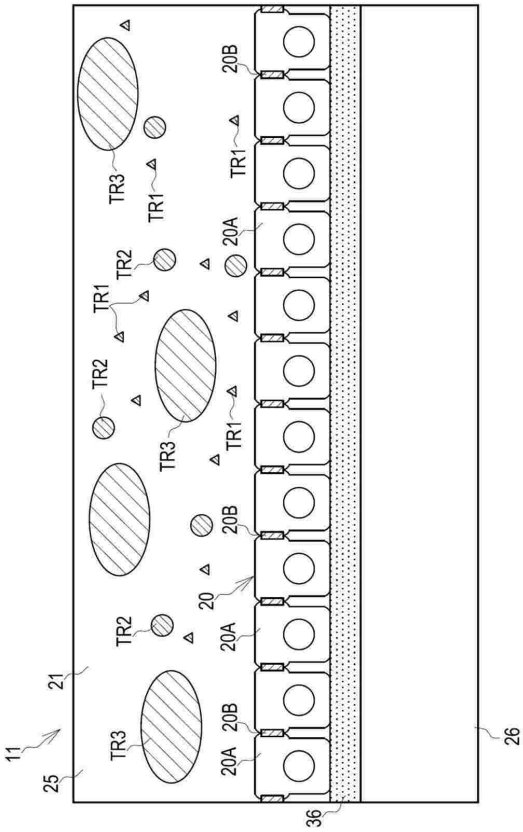
10

20

【図 7】



【図 8】

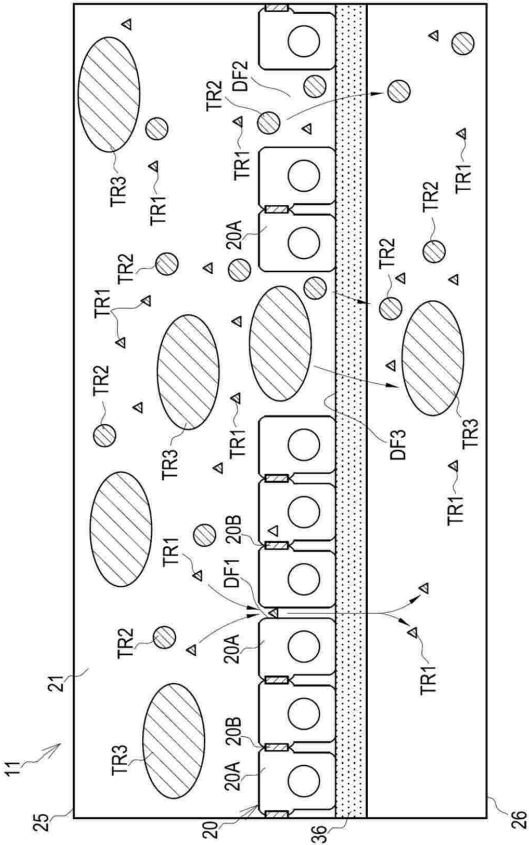


30

40

50

【図 9】



【図 10】

図10A

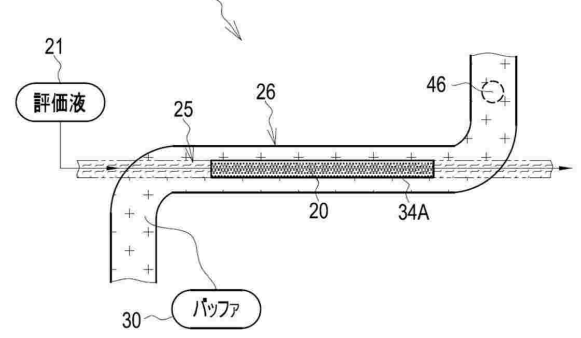
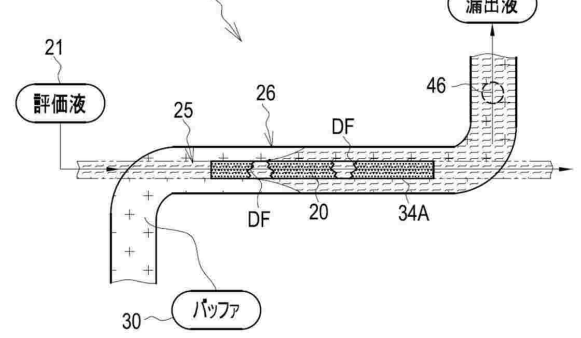
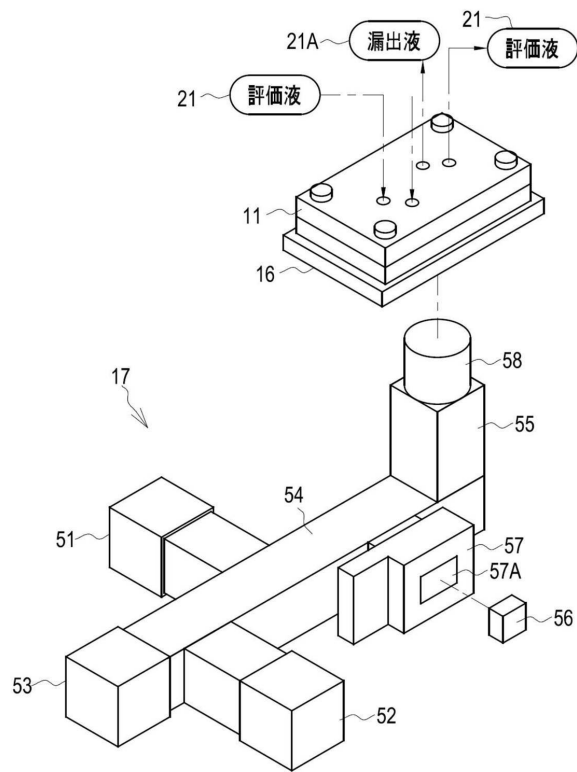


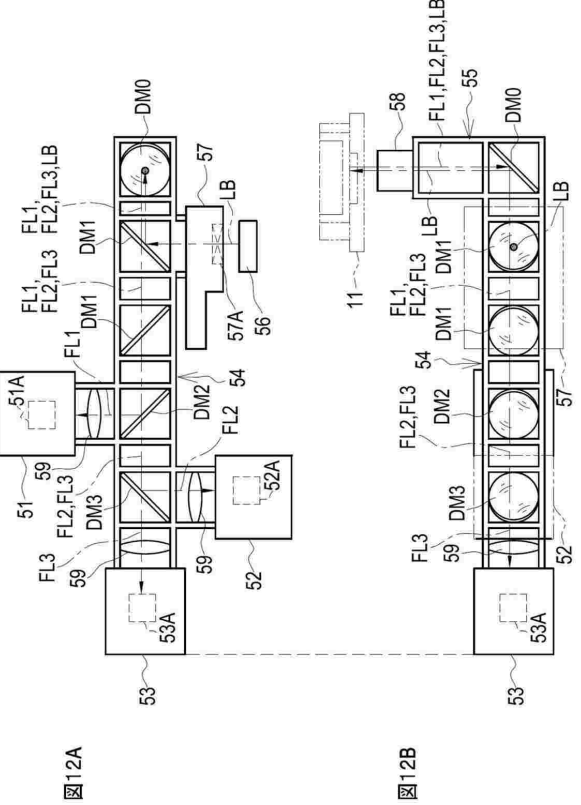
図10B



【図 11】



【図 12】



10

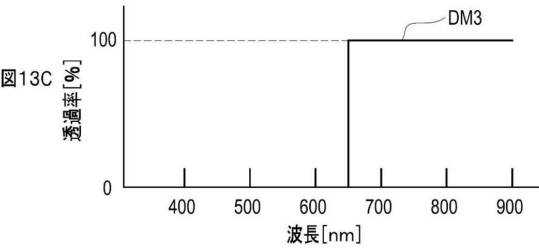
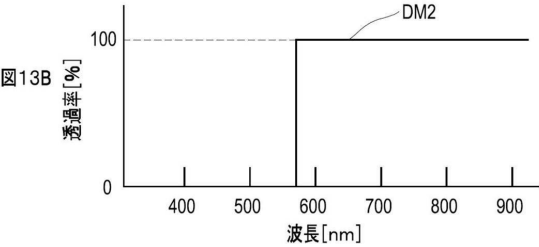
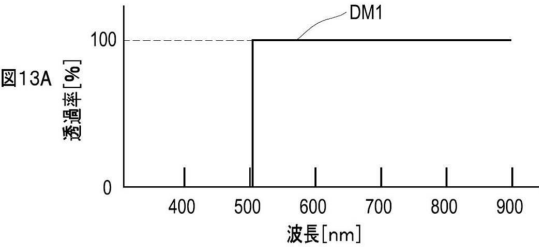
20

30

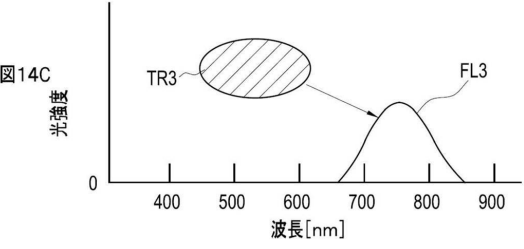
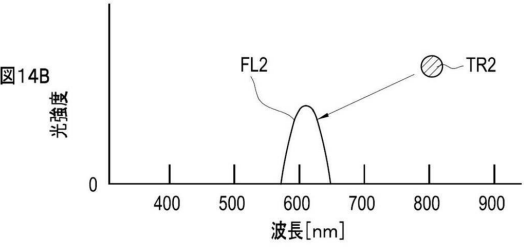
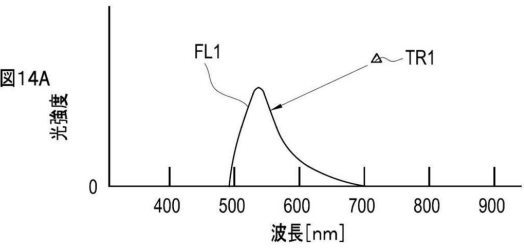
40

50

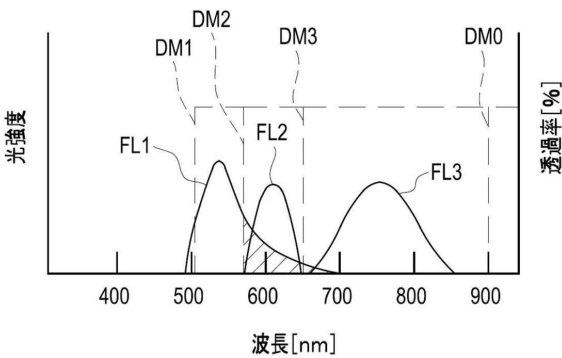
【 図 1 3 】



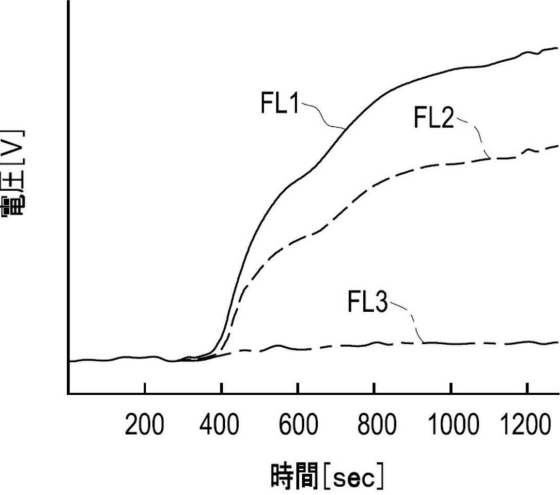
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



10

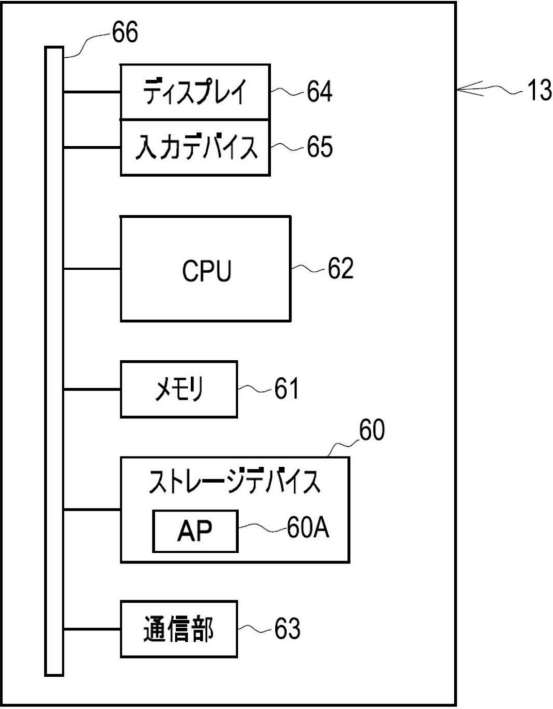
20

30

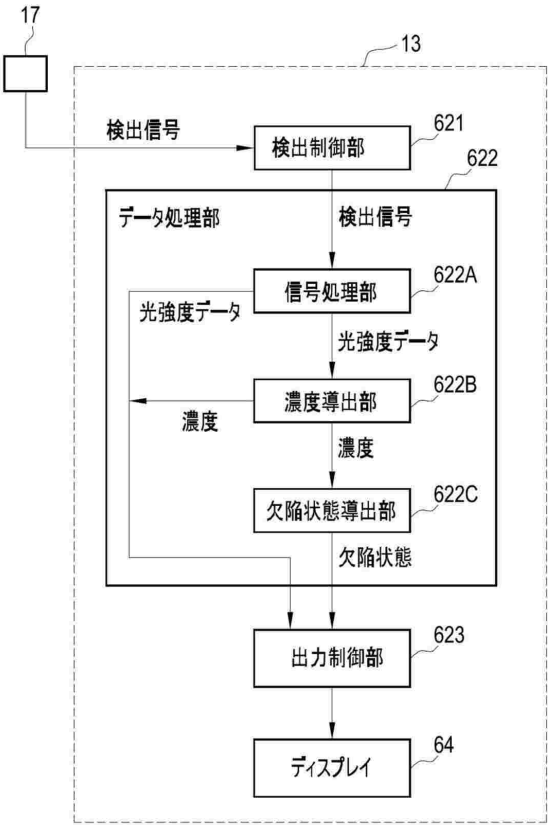
40

50

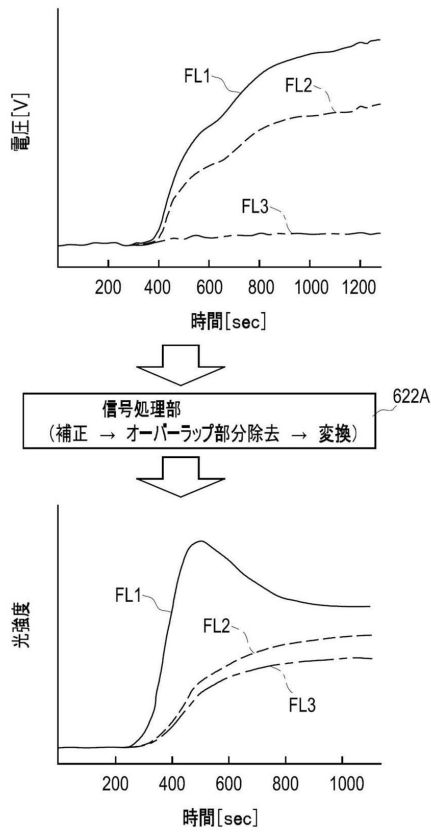
【図 17】



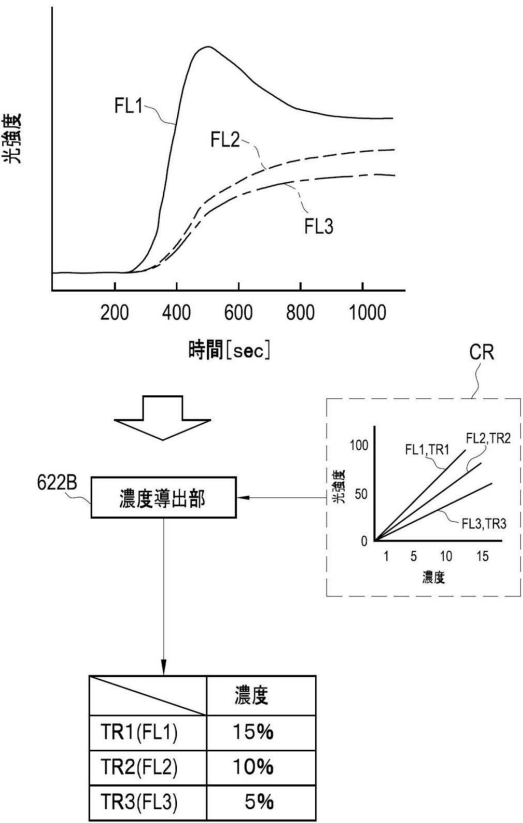
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

20

30

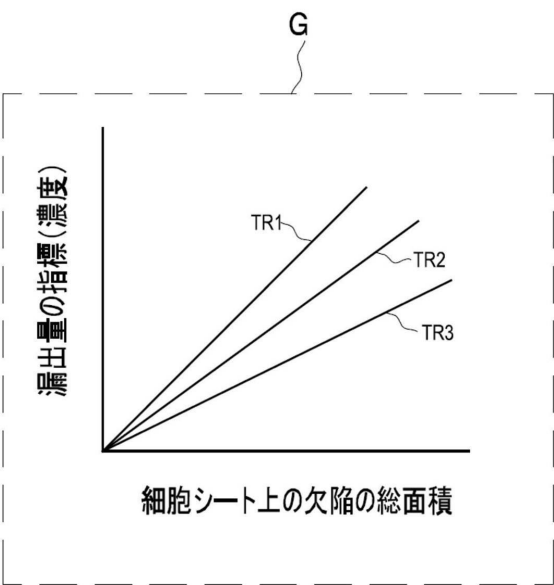
40

50

【 図 2 1 】

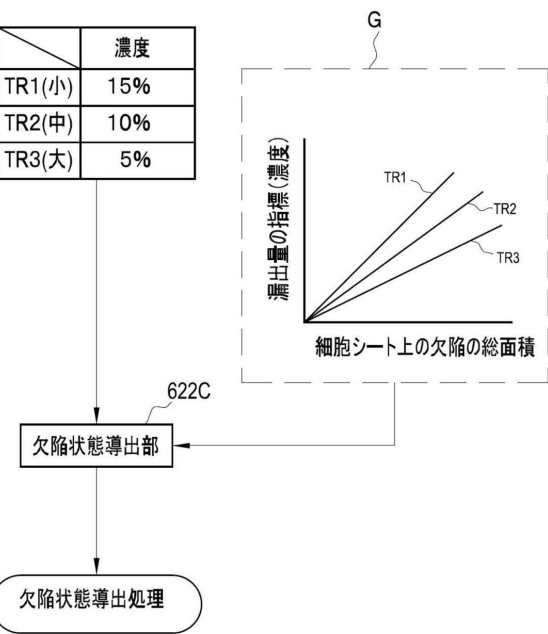
	粒径	欠陥のサイズ毎の透過の可否		
		小サイズ DF1	中サイズ DF2	大サイズ DF3
TR1 (FL1)	小サイズ	可	可	可
TR2 (FL2)	中サイズ	不可	可	可
TR3 (FL3)	大サイズ	不可	不可	可

【 図 2 2 】

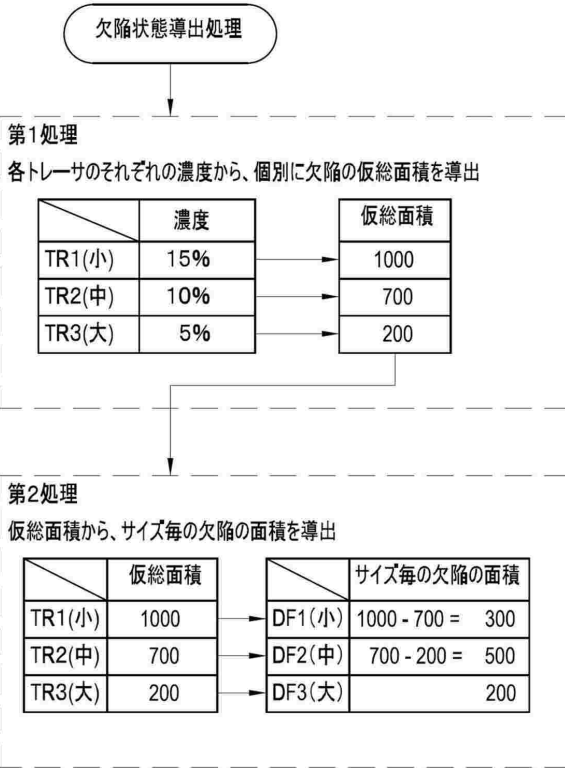


10

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



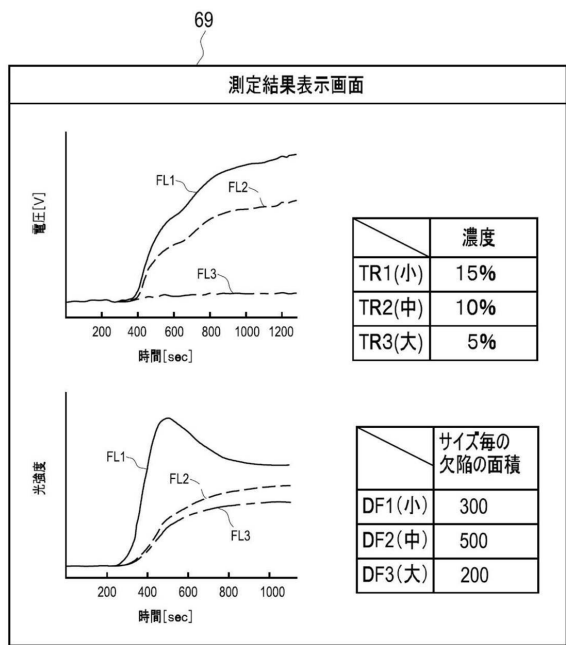
20

30

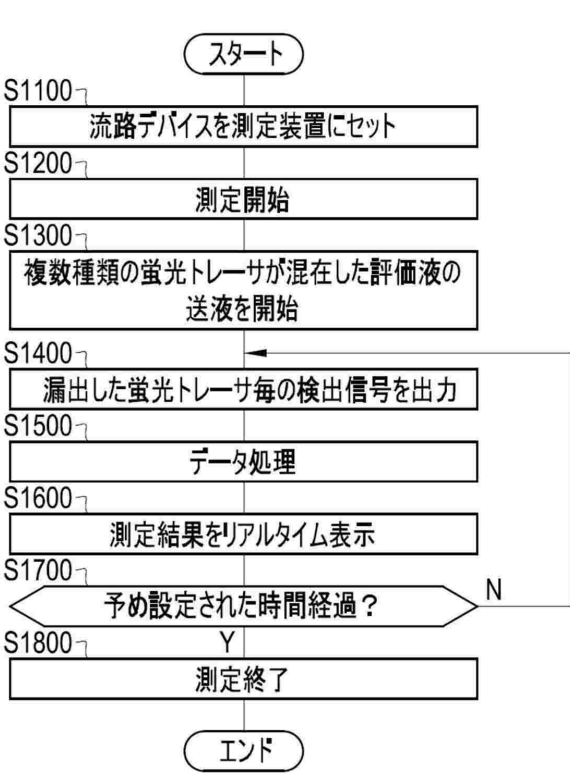
40

50

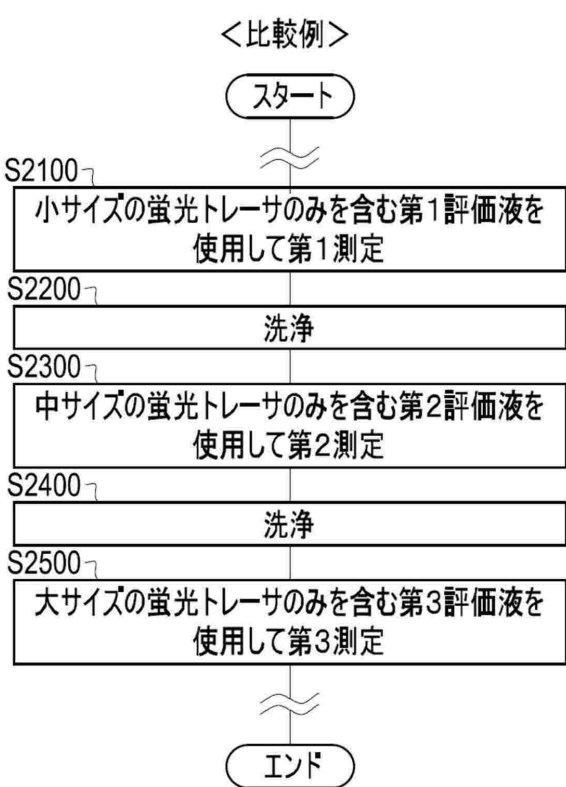
【図 2 5】



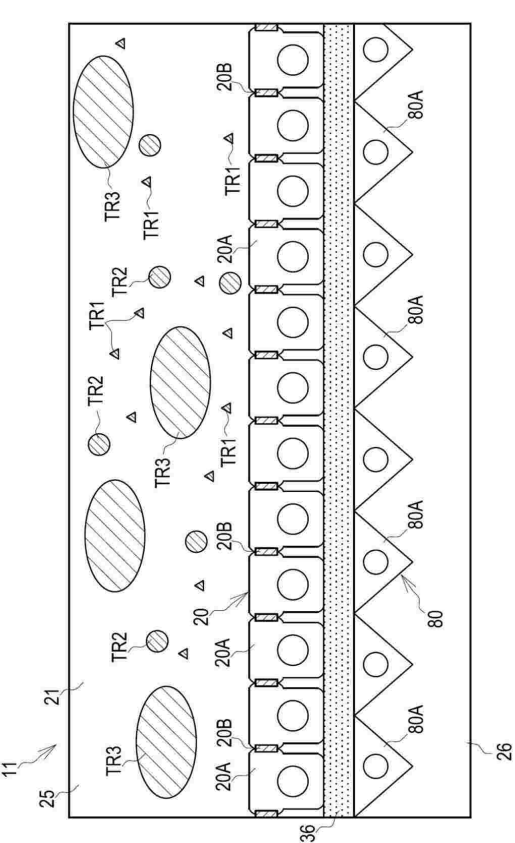
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

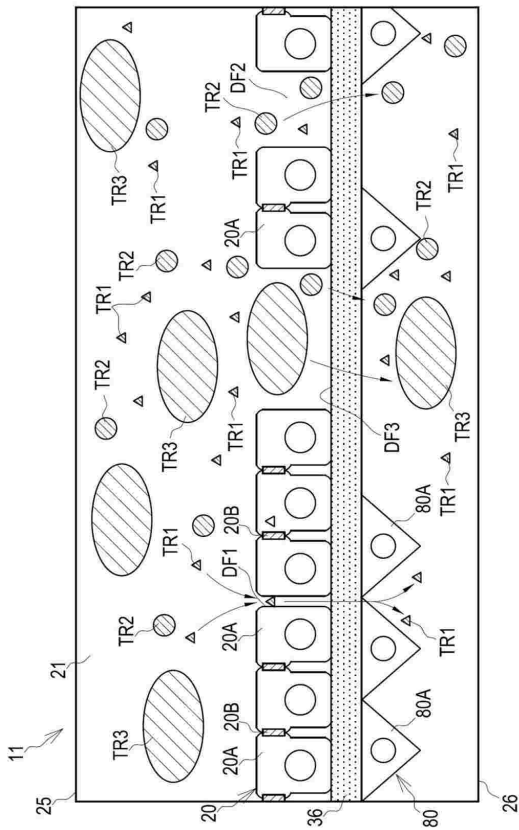
20

30

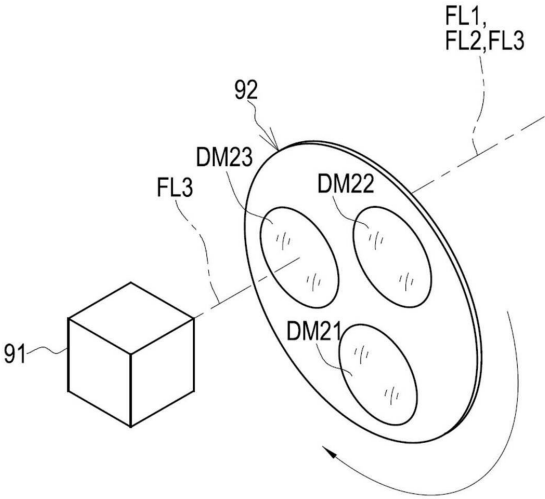
40

50

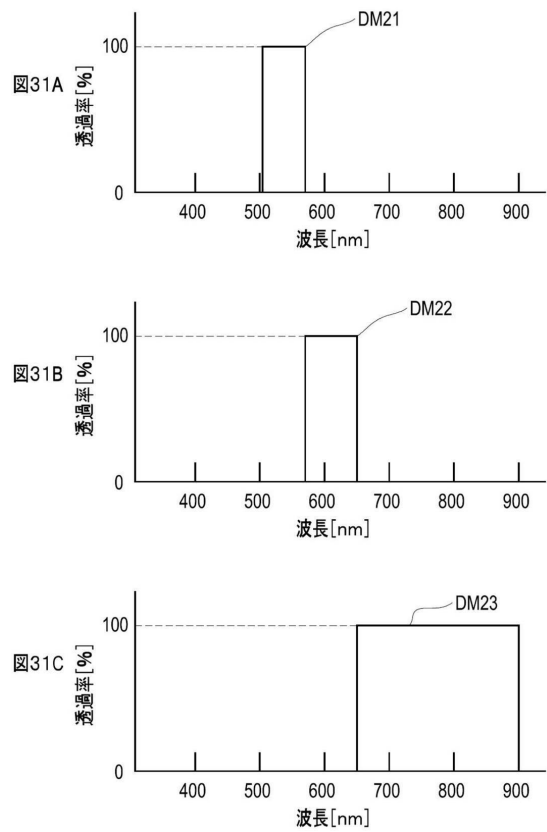
【図 29】



【図 30】



【図 31】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(56)参考文献 特表 2 0 1 8 - 5 2 2 5 8 6 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 1 3 6 0 8 2 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12Q1/00-3/00

C12M1/00-3/10

P u b M e d

B I O S I S / C A P L U S / E M B A S E / M E D L I N E (S T N)

J S T P l u s / J S T 7 5 8 0 / J M E D P l u s (J D r e a m 3)