(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2011/043077

発行日　平成25年3月4日(2013.3.4)

(43)国際公開日　平成23年4月14日(2011.4.14)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		4B029
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	A	4B063
C12N	5/07	(2010.01)	C12N	5/00	202	4B065
C12M	3/00	(2006.01)	C12M	3/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）

出願番号　特願2011-535290 (P2011-535290)
(21)国際出願番号　PCT/JP2010/006007
(22)国際出願日　平成22年10月7日(2010.10.7)
(31)優先権主張番号　特願2009-235306 (P2009-235306)
(32)優先日　平成21年10月9日(2009.10.9)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

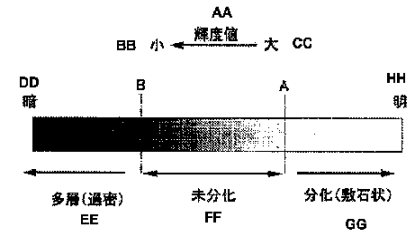
(71)出願人　000000974
川崎重工業株式会社
兵庫県神戸市中央区東川崎町３丁目１番１号
(74)代理人　110000556
特許業務法人　有古特許事務所
(72)発明者　渡壁　慶三
兵庫県神戸市中央区東川崎町３丁目１番１号　川崎重工業株式会社　神戸工場内
(72)発明者　中村　洋一
兵庫県明石市川崎町１番１号　川崎重工業株式会社　明石工場内
(72)発明者　王子　修
兵庫県明石市川崎町１番１号　川崎重工業株式会社　明石工場内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】未分化多能性幹細胞の識別方法及び装置並びに自動培養方法及び装置

(57)【要約】
分化した多能性幹細胞のコロニーと未分化の多能性幹細胞のコロニーとを識別し得るコロニーの識別方法及び未分化の多能性幹細胞の自動培養方法並びにそれらの装置を提供する。培養容器内の多能性幹細胞からなるコロニーの撮像画像の画像処理を行うことにより、分化した多能性幹細胞からなる分化コロニー、未分化の多能性幹細胞からなる未分化コロニー及び多能性幹細胞が多層に重なった多層コロニーを識別する。即ち、第１の閾値Ａより明るい輝度を有するコロニーを分化コロニーであると判断し、第１の閾値Ａに等しいかこれより暗く第２の閾値Ｂに等しいかこれより明るい輝度を有するコロニーを未分化コロニーであると判断し、第２の閾値Ｂより暗い輝度を有するコロニーを多層コロニーであると判断する。

[図8]



AA LUMINANCE VALUE
BB LOWER
CC HIGHER
DD DARKER
EE MULTILAYERED (OVERCROWDED)
FF UNDIFFERENTIATED
GG DIFFERENTIATED (COBBLESTONE-LIKE)
HH BRIGHTER

【特許請求の範囲】
【請求項１】
多能性幹細胞からなるコロニーの撮像画像により、コロニーの識別を行う方法であって、前記撮像画像における輝度に基づいて、分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと未分化多能性幹細胞のみを含む未分化コロニーとを識別することを特徴とするコロニーの識別方法。
【請求項２】
前記コロニーの輝度に基づいて、多層に重なった多能性幹細胞を含む多層コロニーを更に識別することを特徴とする請求項１に記載のコロニーの識別方法。
【請求項３】
前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗い輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断する請求項１に記載のコロニーの識別方法。
【請求項４】
前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗く第２の閾値に等しいかこれより明るい輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断し、前記第２の閾値より暗い輝度の領域を有するコロニーを前記多層コロニーであると判断する請求項２に記載のコロニーの識別方法。
【請求項５】
前記第１の閾値は、前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に対して、判別分析法を適用することにより求められることを特徴とする請求項３に記載のコロニーの識別方法。
【請求項６】
前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に対して判別分析法を適用することにより、前記第１の閾値が求められ、
前記撮像画像に一回又は複数回の平滑化フィルタによる処理を施すことにより得られる平滑化フィルタ画像の画素のうち、前記第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じて得た閾値より小さい輝度値を有する画素のみ抽出することにより前記コロニー領域のみの画像を得、該コロニー領域のみの画像の各画素について輝度値を横軸とするとともに該輝度値を有する画素数を縦軸とするヒストグラムを求め、前記第１の閾値及び該ヒストグラムの最大値に相当する輝度値のうちの何れか小さい方の輝度値を最大輝度値とし、該最大輝度値より小さい輝度値の領域において、前記最大輝度値における画素数の９０％の画素数から、前記最大輝度値の２０％の画素数までの間に存在する前記ヒストグラム上の点の座標を用いて最小二乗法により直線を求め、該直線と前記横軸との交点を前記第２の閾値として求めることを特徴とする請求項４に記載のコロニーの識別方法。
【請求項７】
請求項１乃至６の何れかに記載のコロニーの識別方法により前記未分化コロニーと該未分化コロニー以外のコロニーとを識別する工程、
前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する工程、
前記培養容器に細胞剥離剤を導入する工程、
前記位置情報に基づいて、前記未分化コロニーを剥離させる工程、及び
該未分化コロニーの剥離により得られる未分化多能性幹細胞を回収する工程
を包含することを特徴とする未分化多能性幹細胞の自動培養方法。
【請求項８】
請求項１乃至６の何れかに記載のコロニーの識別方法により前記未分化コロニーと該未分化コロニー以外のコロニーとを識別する工程、
前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する工程、

前記培養容器に細胞剥離剤を導入する工程、
前記位置情報に基づいて、前記未分化コロニー以外のコロニーを剥離させる工程、
該未分化コロニー以外のコロニーの剥離により得られる多能性幹細胞を廃棄する工程、及び
前記未分化コロニーを剥離させて未分化多能性幹細胞を回収する工程
を包含することを特徴とする未分化多能性幹細胞の自動培養方法。

【請求項９】
輝度値に基づいて画像処理された撮像画像を入力する画像入力手段と、
前記各コロニーの前記輝度に基づいて、分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと未分化の多能性幹細胞のみからなる未分化コロニーとを識別する識別手段と、
を備えたことを特徴とするコロニー識別装置。

【請求項１０】
前記識別手段は、前記コロニーの輝度に基づいて、多層に重なった多能性幹細胞を含む多層コロニーを更に識別することを特徴とする請求項９記載のコロニー識別装置。

【請求項１１】
前記識別手段は、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗い輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断することを特徴とする請求項９に記載のコロニー識別装置。

【請求項１２】
前記識別手段は、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗く第２の閾値に等しいかこれより明るい輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断し、前記第２の閾値より暗い輝度の領域を有するコロニーを前記多層コロニーであると判断することを特徴とする請求項１１に記載のコロニー識別装置。

【請求項１３】
前記第１の閾値は、前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に判別分析法を適用することにより求められることを特徴とする請求項１１に記載のコロニーの識別装置。

【請求項１４】
前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に判別分析法を適用することにより、前記第１の閾値が求められ、
前記撮像画像に一回又は複数回の平滑化フィルタによる処理を施すことにより得られる平滑化フィルタ画像の画素のうち、前記第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じて得た閾値より小さい輝度値を有する画素のみ抽出することにより前記コロニー領域のみの画像を得、該コロニー領域のみの画像の各画素について輝度値を横軸とするとともに該輝度値を有する画素数を縦軸とするヒストグラムを求め、前記第１の閾値及び該ヒストグラムの最大値に相当する輝度値のうちの何れか小さい方の輝度値を最大輝度値とし、該最大輝度値より小さい輝度値の領域において、前記最大輝度値における画素数の９０％の画素数から、前記最大輝度値の２０％の画素数までの間に存在するヒストグラム上の点の座標を用いて最小二乗法により直線を求め、該直線と前記横軸との交点を前記第２の閾値として求めることを特徴とする請求項１２に記載のコロニーの識別装置。

【請求項１５】
請求項９乃至１４の何れかに記載のコロニー識別装置と、
前記培養容器に細胞剥離剤を導入する剥離剤導入手段と、
前記各コロニーの位置情報に基づいて、前記未分化コロニーを剥離させるとともに、該未分化コロニーの剥離により得られる未分化多能性幹細胞を回収するピペッティング装置と

を備えたことを特徴とする未分化多能性幹細胞の自動培養装置。
【請求項１６】
請求項９乃至１４の何れかに記載のコロニー識別装置と、
前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する位置情報取得手段と、
前記培養容器に細胞剥離剤を導入する剥離剤導入手段と、
前記位置情報取得手段において取得した位置情報に基づいて、前記未分化コロニー以外のコロニーを剥離させ、該未分化コロニー以外のコロニーの剥離により得られる多能性幹細胞を廃棄し、更に前記未分化コロニーを剥離させて未分化多能性幹細胞を回収するピペッティング装置と、
を備えたことを特徴とする未分化多能性幹細胞の自動培養装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、未分化多能性幹細胞の識別方法及び装置並びに自動培養方法及び装置に関し、より詳細には、未分化の多能性幹細胞とそれ以外の多能性幹細胞とを識別する方法及び装置と、これらの方法及び装置を用いた未分化多能性幹細胞の自動培養方法及び装置に関する。
【背景技術】
【０００２】
近年、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞などの多能性幹細胞（本明細書においては、「ＥＳ細胞」と「ｉＰＳ細胞」とを総称して「多能性幹細胞」という。）が人工的に創り出されるに至り、再生医療などの分野で大きな寄与が期待されている。多能性幹細胞は生体を構成する種々の細胞に分化し得る分化万能性を有しているため、患者自身のｉＰＳ細胞を用いることにより、拒絶反応を起こすことなく皮膚、軟骨、骨、血管、神経、臓器等を再生することが可能となる。
【０００３】
多能性幹細胞は上述のように分化万能性を有しているため、培養の途中で一部の多能性幹細胞が分化を開始してしまう場合がある。このように分化を開始した細胞は再び未分化の状態に戻すことはできず、目的とする臓器や器官の作成には使用できないこととなる。従って、多能性幹細胞の継代に際しては、未分化多能性幹細胞のみを選択的に継代することが重要である。
【０００４】
このような未分化多能性幹細胞の識別は、例えば「ＡＶＩＳＯ社」の「ＣｅｌｌＣｅｌｅｃｔｏｒ」を用い、細胞の染色や蛍光観察により行うことができる。しかしながら、一般に染色は細胞を固定化してから行うことが多く、また色素が細胞に対して毒性を示すことが多いため、細胞を生きたまま観察することは困難である。また、低毒性の色素を用いたとしても、細胞にとってはやはり毒であり、再生医療分野への応用には不適切である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明は、上記従来技術の問題点を解決するために為されたものであり、本発明の目的は、多能性幹細胞の培養に際してその一部が分化を開始した場合にも、未分化多能性幹細胞のみからなるコロニーを選択的に識別し得る方法及び装置を提供し、並びに未分化多能性幹細胞のみを自動的に培養し得る方法及び装置を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明のコロニーの識別方法は、培養容器内の多能性幹細胞からなるコロニーの撮像画像により、コロニーの識別を行う方法であって、前記撮像画像における輝度に基づいて、分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと未分化多能性幹細胞のみを含む未分化コロニ

ーとを識別することを特徴とする。

【０００７】

なお、「分化した多能性幹細胞」はもはや「多能性」を有しているとは言えないが、本願では便宜上この用語を使用することとする。

【０００８】

上記において、前記コロニーの輝度に基づいて、多層に重なった多能性幹細胞を含む多層コロニーを更に識別するように構成することができる。

【０００９】

上記においては、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗い輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断するように構成することが可能である。

【００１０】

また、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗く第２の閾値に等しいかこれより明るい輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断し、前記第２の閾値より暗い輝度の領域を有するコロニーを前記多層コロニーであると判断するように構成することも可能である。

【００１１】

ここで、前記第１の閾値は、前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に対して、判別分析法を適用することにより求められる。

【００１２】

また、前記第２の閾値は、以下のようにして求めることができる。即ち、前記撮像画像に一回又は複数回の平滑化フィルタによる処理を施すことにより得られる平滑化フィルタ画像の画素のうち、前記第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じて得た閾値に等しいかこれより小さい輝度値を有する画素のみ抽出することにより前記コロニー領域のみの画像を得、該コロニー領域のみの画像の各画素について輝度値を横軸とするとともに該輝度値を有する画素数を縦軸とするヒストグラムを求め、前記第１の閾値及び該ヒストグラムの最大値に相当する輝度値のうちの何れか小さい方の輝度値を最大輝度値とし、該最大輝度値より小さい輝度値の領域において、前記最大輝度値における画素数の９０％の画素数から、前記最大輝度値における画素数の２０％の画素数までの間に存在する前記ヒストグラム上の点の座標を用いて最小二乗法により直線を求め、該直線と前記横軸との交点を求めることにより、第２の閾値を求めることができる。

【００１３】

本発明の未分化多能性幹細胞の自動培養方法は、上記の何れかに記載の識別方法により前記未分化コロニーと該未分化コロニー以外のコロニーとを識別する工程、前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する工程、前記培養容器に細胞剥離剤を導入する工程、前記位置情報に基づいて、前記未分化コロニーを剥離させる工程、及び該未分化コロニーの剥離により得られる未分化多能性幹細胞を回収する工程を包含することを特徴とする。

【００１４】

また、本発明の未分化多能性幹細胞の自動培養方法は、上記の何れかに記載のコロニーの識別方法により前記未分化コロニーと該未分化コロニー以外のコロニーとを識別する工程、前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する工程、前記培養容器に細胞剥離剤を導入する工程、前記位置情報に基づいて、前記未分化コロニー以外のコロニーを剥離させる工程、該未分化コロニー以外のコロニーの剥離により得られる多能性幹細胞を廃棄する工程、及び前記未分化コロニーを剥離させて未分化多能性幹細胞を回収する工程を包含することを特徴とする。

【００１５】

本発明のコロニー識別装置は、輝度値に基づいて画像処理された撮像画像を入力する画像入力手段と、前記各コロニーの前記輝度に基づいて、分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと未分化の多能性幹細胞のみからなる未分化コロニーとを識別する識別手段と、を備えたことを特徴とする。

【００１６】

ここで、前記識別手段は、前記コロニーの輝度に基づいて、多層に重なった多能性幹細胞を含む多層コロニーを更に識別するように構成することが可能である。

【００１７】

上記において、前記識別手段は、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗い輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断するように構成することが可能である。

【００１８】

また、前記識別手段は、前記輝度の第１の閾値より明るい輝度の領域を有するコロニーを前記分化コロニーであると判断し、前記第１の閾値に等しいかこれより暗く第２の閾値に等しいかこれより明るい輝度の領域のみを有するコロニーを前記未分化コロニーであると判断し、前記第２の閾値より暗い輝度の領域を有するコロニーを前記多層コロニーであると判断するように構成することも可能である。

【００１９】

ここで、前記第１の閾値は、前記撮像画像に一回又は複数回のメジアンフィルタによる処理を施すことにより得られるメジアンフィルタ画像について求めた各輝度値に対する画素数の分布に対して、判別分析法を適用することにより求められる。

【００２０】

また、前記第２の閾値は、以下のようにして求めることができる。即ち、前記撮像画像に一回又は複数回の平滑化フィルタによる処理を施すことにより得られる平滑化フィルタ画像の画素のうち、前記第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じて得た閾値に等しいかこれより小さい輝度値を有する画素のみ抽出することにより前記コロニー領域のみの画像を得、該コロニー領域のみの画像の各画素について輝度値を横軸とするとともに該輝度値を有する画素数を縦軸とするヒストグラムを求め、前記第１の閾値及び該ヒストグラムの最大値に相当する輝度値のうちの何れか小さい方の輝度値を最大輝度値とし、該最大輝度値より小さい輝度値の領域において、前記最大輝度値における画素数の９０％の画素数から、前記最大輝度値における画素数の２０％の画素数までの間に存在する前記ヒストグラム上の点の座標を用いて最小二乗法により直線を求め、該直線と前記横軸との交点を求めることにより、第２の閾値を求めることができる。

【００２１】

本発明の未分化多能性幹細胞の自動培養装置は、上記の何れかに記載のコロニー識別装置と、前記培養容器に細胞剥離剤を導入する剥離剤導入手段と、前記各コロニーの位置情報に基づいて、前記未分化コロニーを剥離させるとともに、該未分化コロニーの剥離により得られる未分化多能性幹細胞を回収するピペッティング装置とを備えたことを特徴とする。

【００２２】

また、本発明の未分化多能性幹細胞の自動培養装置は、上記のコロニー識別装置と、前記未分化コロニー及び該未分化コロニー以外のコロニーの位置情報を取得する位置情報取得手段と、前記培養容器に細胞剥離剤を導入する剥離剤導入手段と、前記位置情報取得手段において取得した位置情報に基づいて、前記未分化コロニー以外のコロニーを剥離させ、該未分化コロニー以外のコロニーの剥離により得られる多能性幹細胞を廃棄し、更に前記未分化コロニーを剥離させて未分化多能性幹細胞を回収するピペッティング装置と、を備えたことを特徴とする。

【発明の効果】

【００２３】

本発明のコロニーの識別方法及び装置は、培養容器内の多能性幹細胞からなるコロニーの撮像画像を得、これを画像処理することにより、各コロニーの輝度に基づいて分化コロニーと未分化コロニーとを識別することを可能としている。従って、多能性幹細胞の培養に際してその一部のコロニーが分化を開始した場合にも、未分化多能性幹細胞のみを識別することが可能となる。また、このようにコロニーを識別することにより、未分化の多能性幹細胞のみを選択的に継代し得る自動培養方法及び装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２４】

【図１】多能性幹細胞が存在しないディッシュにおける照明光の散乱状態を示す模式図である。

【図２】未分化の多能性幹細胞が存在するディッシュにおける照明光の散乱状態を示す模式図である。

【図３】分化した多能性幹細胞が存在するディッシュにおける照明光の散乱状態を示す模式図である。

【図４】多層化した多能性幹細胞が存在するディッシュにおける照明光の散乱状態を示す模式図である。

【図５】ディッシュ内の撮像画像を示す図である。

【図６】図５のＣの領域を位相差顕微鏡により撮影した画像を示す図である。

【図７】図５のＤの領域を位相差顕微鏡により撮影した画像を示す図である。

【図８】画像処理後における分化コロニー、未分化コロニー及び多層コロニーを識別するための第１の閾値Ａ及び第２の閾値Ｂを表す図である。

【図９】分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと、未分化多能性幹細胞のみを含む未分化コロニーとが混在する培養容器内の模式図である。

【図１０】ディッシュ内の撮像画像を取得する撮像装置（カメラ）を示す斜視図である。

【図１１】ピペッティングにより培養液を吐出して未分化コロニーの剥離を行うピペッティング装置を示す斜視図である。

【図１２】ピペッティングにより剥離した未分化の多能性幹細胞の回収を行うピペッティング装置を示す斜視図である。

【図１３】１回のピペッティングにより剥離される範囲を表す模式図である。

【図１４】未分化コロニーの大きさが１回のピペッティングにより剥離される範囲より小さい場合のピペッティング操作を示す模式図である。

【図１５】未分化コロニーの大きさが１回のピペッティングにより剥離される範囲より大きい場合のピペッティングの範囲を示す模式図である。

【図１６】未分化コロニーの大きさが１回のピペッティングにより剥離される範囲より大きい場合のピペッティング操作の手順を示す模式図である。

【図１７】未分化コロニーの近傍に分化コロニーが存在する場合のピペッティング操作を示す模式図である。

【図１８】第１の閾値および第２の閾値の決定方法の説明に使用するための撮影画像を示す図である。

【図１９】図１８に示す画像について求めた、輝度値に対する画素数の分布を表すヒストグラムである。

【図２０】図１８の画像に対して、１０回のメジアンフィルタ処理を行った後の画像である。

【図２１】図１８の画像に対して、１０回のガウシアンフィルタ処理を行った後の画像である。

【図２２】図２１の画像について求めた、輝度値に対する画素数の分布を表すヒストグラムである。

【図２３】第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じた閾値を用いることにより得られるコロニー抽出画像である。

【図２４】図２３の画像について求めた輝度値に対する画素数の分布を表すヒストグラム

である。
【図２５】図２４のヒストグラムを用いて第２の閾値を求める方法を示す説明図である。
【図２６】図１８の画像における、第１の閾値１３２に等しいかこれより暗く第２の閾値７３に等しいかこれより明るい輝度の領域のみからなる画像である。
【図２７】図１８の画像における、第１の閾値１４０に等しいかこれより暗く第２の閾値７３に等しいかこれより明るい輝度の領域のみからなる画像である。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
本発明の実施形態について、図面を参照しながら以下に説明するが、本発明は以下の記載に限定されるものではない。
【００２６】
本発明コロニーの識別方法においては、分化した多能性幹細胞を含む分化コロニーと、未分化の多能性幹細胞のみを含む未分化コロニーとの識別が行われ、更に多層に重なった多能性幹細胞を含む多層コロニーの識別も行うことができる。この識別は、培養容器内に培養されたコロニーを形成している多能性幹細胞の画像処理を行い、画像処理後の画像における各コロニーの輝度に基づいて行われる。なお、ここでの画像処理は、主として各画素の輝度を、例えばモノクロの０～２５５階調（８ビット）の範囲の輝度にノーマライズすることをいう。なお、本実施形態では８ビット２５６階調としたが、本発明はこれに限定されるものではなく、これより階調数を大きく又は小さくすることが可能である。
【００２７】
輝度によるコロニーの識別は、以下のような知見に基づいている。即ち、図１に示すように、ディッシュの底面１０に細胞などが付着していない場合、照明光１２はディッシュの底面１０を透過した後、殆ど散乱せずに撮像光１３としてカメラなどからなる撮像装置１１に到達するため、得られる画像は明るいものになる。これに対して、図２に示すように、ディッシュの底面１０に多能性幹細胞等が付着している場合、照明光１２は多能性幹細胞２１ａによって散乱されることになる。ここで、未分化の多能性幹細胞２１ａでは、後述する分化した多能性幹細胞に比較して核２２以外の部分の占める割合が小さく、相対的に大きな核２２を有しているため、図２に示すように、照明光１２は比較的大きく散乱されることになる。そのため、撮像装置１１に到達する撮像光１４は少なくなり、得られる未分化の多能性幹細胞２１ａの部分の画像は暗くなる。一方、分化した多能性幹細胞は、図３に示すように、核２２に対して核２２以外の部分が大きくなっており、相対的に核２２の部分が小さくなる。そのため、図２の未分化多能性幹細胞の場合より照明光１２が受ける散乱は小さくなり、撮像装置１１に到達する撮像光１５は多くなる。従って、得られる分化多能性幹細胞２１ｂの部分の画像は、図２の未分化多能性幹細胞の場合より明るくなる。更に、多能性幹細胞の培養が過剰に行われるなどにより、図４に示すように、多能性幹細胞２１ｃが多層に重なった多層コロニーの場合は、照明光１２は図２の場合より大きく散乱されるため、撮像装置１１に到達する撮像光１６は非常に少なくなり、得られる未分化の多能性幹細胞２１ｃの部分の画像は非常に暗くなる。
【００２８】
なお、上記のように散乱光の強弱によりコロニーの識別を行う場合、照明方法によって細胞の見え方は異なるので、分化細胞は明るく、未分化細胞は中程度の明るさに、多層化した細胞は暗く見えるようにするために、照明光として、観察位置に対して透過照明光を一方向から照射することが好ましい。
【００２９】
図５は、多能性幹細胞の一種であるｉＰＳ細胞を培養したディッシュを撮影した画像である。図６は図５のＣの領域を位相差顕微鏡により撮影した画像を画像処理したものを示しており、この領域Ｃは未分化多能性幹細胞からなる未分化コロニーである。また、図７は図５のＤの領域を位相差顕微鏡により撮影した画像を画像処理したものを示している。図７における領域Ｅは分化した多能性幹細胞からなり、領域Ｆは多層に重なった多能性幹細胞が存在する領域である。図６及び図７から分かるように、未分化多能性幹細胞からな

る未分化コロニーの領域Ｃと、分化した多能性幹細胞の領域Ｅと、多層に重なった多能性幹細胞の領域Ｆは、撮像画像の明るさにより識別することが可能であることが分かる。なお、ｉＰＳ細胞の培養を行う場合、ｉＰＳ細胞の増殖環境を整えるためのフィーダ細胞をディッシュの全面にｉＰＳ細胞の培養に先だって生育させておく場合があるが、このフィーダ細胞はｉＰＳ細胞よりかなり小さいため、上記の撮像画像においては、バックグラウンドのノイズとして現れる。

【００３０】

図８は、特定のコロニーが上記３つの領域の何れに相当するかを判断する場合の判断基準を模式的に示したものである。本発明においては、図８に示すように、コロニーの画像の輝度が第１の閾値Ａより明るい場合に分化コロニーであると判断され、第１の閾値Ａに等しいかこれより暗く、かつ、第２の閾値Ｂに等しいかこれより明るい場合に未分化の領域であると判断され、第２の閾値Ｂより暗い輝度を有するコロニーを多能性幹細胞が多層に重なった領域であると判断される。

【００３１】

次に、第１の閾値Ａの決定方法について説明する。まず、図１０に示すように、多能性幹細胞が培養されたディッシュ４１内を蓋４２を介してカメラ４３により広域撮像画像を撮影する。次に、この画像を２５６階調にノーマライズすることにより、図１８に示す画像を得る。なお、ディッシュ４１内の撮影は、蓋４２を外した状態で行ってもよい。

【００３２】

次に、図１８の画像に対して、メジアンフィルタによる処理を一回又は複数回施すことにより、メジアンフィルタ画像が作成される。メジアンフィルタは、画像におけるエッジ情報を残したまま、フィーダ細胞などの画像や細かいノイズを除去する機能を有している。ここで、メジアンフィルタによる処理回数は、ノイズの大きさ、画像における１画素の実距離、フィルタサイズに応じて決められる。

【００３３】

メジアンフィルタによる処理回数を決定する際の具体的な説明は、以下のとおりである。図１８の画像ではフィーダ細胞がノイズになっている。一般的なフィーダ細胞の大きさは、長さが３００μｍで太さが３０μｍ程度であるが、大きいものでは太さが１００μｍのフィーダ細胞も存在する。図１８の画像の撮影には、撮像素子間隔が４．６５μｍのカメラと倍率が０．２１８倍のレンズを用いており、この場合、１画素の実距離は２１．３μｍである。ここでは、３×３画素の範囲で処理を行うフィルタを採用し、従って、１回のフィルタ処理によって例えば左右方向では２画素に相当する実距離の範囲の情報を用いて処理を行うこととなる。１０回のフィルタ処理では、２０画素に相当する実距離の範囲の情報を用いて処理を行うこととなる。フィーダ細胞の最大太さである１００μｍの大きさのノイズに対してフィルタ処理を行う場合、ノイズの大きさの２倍以上の範囲でのフィルタ処理を行うのが効果的である。図１８の画像の場合、２００μｍの範囲で処理を行うフィルタを採用することが望ましく、そのためには５回以上のフィルタ処理が必要となる。なお、ここではよりフィルタ効果を高めるために、フィルタ処理回数を２倍の１０回とした。

【００３４】

図２０は、図１８の画像に対し１０回のメジアンフィルタ処理を行った後の画像である。図２０から、メジアンフィルタ処理後の画像では、小さなフィーダ細胞によると思われる画像やノイズが除去されていることが分かる。次に、メジアンフィルタ画像について、輝度値に対する画素数の分布が求められる。更に、この分布に対して判別分析法を適用することにより、第１の閾値Ａが求められる。本実施形態では、第１の閾値Ａ＝１３２が得られた。

【００３５】

次に、第２の閾値Ｂの決定方法について説明する。第２の閾値Ｂの決定に際して、まず、コロニーの存在する領域のみを抽出するためのコロニー閾値が求められる。コロニー閾値は、図１８に示す画像について輝度値に対する画素数の分布を表すヒストグラム（図１

９）を用いて決定される。まず、図１８の画像に対して、平滑化フィルタの一種であるガウシアンフィルタによる処理を一回又は複数回施すことにより、ガウシアンフィルタ画像が作成される。ガウシアンフィルタは、ノイズを除去する機能と、処理対象の画素と周辺画素との間で大幅な輝度値変化を防ぐ機能とを有し、これにより、滑らかな画像が得られる。ここで、平滑化フィルタとして、他の例えば移動平均フィルタを用いてもよい。ガウシアンフィルタによる処理の回数は、ノイズの大きさ、画像における１画素の実距離、フィルタサイズに応じて決められ、その詳細な説明は、前述のメジアンフィルタによる処理回数の決定についての説明と同様である。本実施形態では１０回のガウシアンフィルタ処理を行った。図２１はガウシアンフィルタを１０回施した後の画像であり、図２２はそのヒストグラムである。図１８と図２１との比較から、ガウシアンフィルタ処理後の画像の方が滑らかになっていることが分かる。また、図１９と図２２との比較から、ガウシアンフィルタ処理後ではヒストグラムのピークが高くなり、ピーク位置も移動していることが分かる。

【００３６】

次に、ガウシアンフィルタ処理後の画像において、コロニーの存在する領域とコロニーが存在しない領域とを識別するためのコロニー閾値が求められる。コロニー閾値は、前述の第１の閾値に１０５～１１５％の範囲の所定の倍率を乗じることにより得られる。ガウシアンフィルタ処理後の画像から、コロニー閾値より小さい輝度値を有する画素のみ抽出することによりコロニー領域のみの画像が得られる。

【００３７】

ここで、第１の閾値に乗算される上記倍率は、次に説明する実験によって決められる。すなわち、仮に設定した倍率によって仮のコロニー閾値を設定し、この閾値を用いて仮のコロニー抽出画像を作成する。ここで得られたコロニー抽出範囲と、人間が目視観察または顕微鏡観察または染色画像から判断したコロニー範囲とを比較し、人間が判断したコロニー範囲が大きい場合は倍率を上げる。また、ここで得られたコロニー抽出範囲と、人間が目視観察または顕微鏡観察または染色画像から判断したコロニー範囲とを比較し、人間が判断したコロニー範囲が小さい場合は倍率を下げる。なおこの乗率は、画像の撮影条件、多能性幹細胞の培養条件、培養する多能性幹細胞株の種類が定まれば一定となる。本実施形態では上記倍率を１１０％とし、輝度値＝１４５をコロニー閾値とした。

【００３８】

図２３は、このようにして得たコロニー抽出画像である。なお図２３では、剥離して回収するのが適さないと判断されるような小面積のコロニーは除外している。また図２３では、コロニー内部に存在する輝度値が１４５より大きい領域もコロニーの一部としている。図２４は、図２３における輝度値に対する画素数の分布を表すヒストグラムである。図２３ではコロニー以外の部分は全て白色（輝度値２５５）となるので、図２４の輝度値２５５に対する画素数は非常に大きくなる（図示せず）。

【００３９】

このようにしてコロニー抽出画像を得た後、第２の閾値が求められる。図２４に示すヒストグラムにおいて、第１の閾値Ａ＝１３２と、このヒストグラムの最大値に相当する輝度値、即ち、輝度値＝１３０のうちの何れが小さい方が、以下の最小二乗法の計算範囲の設定における、最大輝度値とされる。本実施形態では、最大輝度値＝１３０である。そして、図２５に示すように、輝度値が最大輝度値より小さい領域における、この最大輝度値に対応する前記ヒストグラム上の画素数（縦座標値）の９０％の画素数から２０％の画素数までの間に存在するヒストグラム上の点の座標を用いて最小二乗法により直線が求められる。次に、最小二乗法により求めたこの直線と横軸との交点が、第２の閾値Ｂとして求められる。本実施形態では第２の閾値Ｂ＝７３であった。

【００４０】

以上のようにして求めた第２の閾値Ｂと、前述の第１の閾値Ａとにより、未分化の細胞のみの画像が得られる。即ち、第１の閾値Ａ＝１３２に等しいかこれより輝度値が小さく、かつ、第２の閾値Ｂ＝７３に等しいかこれより輝度値が大きい領域のみからなる画像が

未分化の細胞のみの画像として得られる。図２６は本実施形態において上記のようにして得られた未分化の細胞のみの画像である。

【００４１】

なお、上述のように判別分析法により求めた輝度値１３２を第１の閾値Ａとして用いる場合、実際には未分化細胞であるにも拘わらず分化細胞であると判断されてしまう場合には、判別分析法により求めた閾値に１００％～１１５％（但し、前述のコロニー閾値を得るための倍率を超えない）の範囲で所定の倍率を乗じることにより得られた輝度値を第１の閾値Ａとして用いると、より正確に未分化細胞を識別できる場合がある。ここで、判別分析法により求めた閾値に乗算される上記倍率は、実験によって決められる。

【００４２】

１００％の倍率によって仮の第１の閾値を設定し、この閾値を用いて未分化コロニーのみの画像を作成する。ここで得られた未分化コロニーのみの画像において、微小な面積の未分化コロニー領域が多数存在する場合は、上記倍率を増やし、微小な面積の未分化コロニー領域数がほとんどなくなったときの倍率を判別分析法により求めた閾値に乗算される上記倍率とする。この乗率を用いて算出した閾値を第１の閾値とする。なおこの乗率は、画像の撮影条件、多能性幹細胞の培養条件、培養する多能性幹細胞株の種類が定まれば一定となる。

【００４３】

図２６では微小な面積の未分化コロニー領域が多数存在しているため、上記乗率を増やすことが望ましい。

【００４４】

図２７は、第１の閾値Ａ＝１４０として求めた未分化の細胞のみの画像である。これは上記乗率を１０６％とした場合である。図２７では微小な面積の未分化コロニー領域が少なく、第１の閾値としてＡ＝１４０を採用することが望ましいことがわかる。

【００４５】

次に、以下のようにしてコロニーからの未分化の多能性幹細胞の回収が行われる。図９は未分化コロニーと分化コロニーとが混在している培養容器の撮像画像を模式的に示しており、未分化の領域は濃く、分化した部分は白抜きで示されている。まず、未分化の多能性幹細胞のみからなる孤立したコロニー３１及び３５は、剥離して回収すべきコロニーとして選択される。周辺が分化を開始したコロニー３２は剥離すべきコロニーから除外される。また、全体が分化してしまったコロニー３３も除外される。更に、内部が部分的に分化しているコロニー３４も剥離すべきコロニーから除外される。一方、コロニー３６は未分化の多能性幹細胞のみからなるが、後述するようにピペッティング装置からの液の吐出により剥離を行うと、ピペッティングの液流の作用が及び得る近傍に存在する分化コロニー３７から分化した多能性幹細胞が剥離してしまうため、コロニー３６は選択されない。このようなコロニーの選択に際しては、ピペッティング装置に装着するチップの種類や吐出液の吐出速度等によって物理的な力の作用する範囲が変化することを考慮する必要がある。剥離方法としてピペッティングよりも位置精度の高いクローニングリング、ガラスキャピラリ等を用いる場合は、未分化コロニーと分化コロニーとの間の距離が小さくても、未分化コロニーのみの剥離を行うことができる。

【００４６】

次に、多能性幹細胞を回収すべき未分化コロニーが選択された後、ピペッティング装置による多能性幹細胞の回収が行われる。まず、培養容器全体に細胞剥離剤が導入される。この剥離剤は、剥離を行う所定時間の間、ディッシュの底面に付着した細胞をピペッティング装置の吐出による培養液の液流により剥離させることができ、かつ、液流がない状態では細胞がディッシュ底面から剥離しないように、その種類、濃度、量等が決められる。細胞剥離剤を含む剥離液を導入した後、図１１に示すように、選択された未分化コロニーに対してピペッティング装置４４から培地が吐出され、その液流により未分化の多能性幹細胞のみが剥離することになる。ピペッティング装置からの培地の吐出は１回に限らず、同じ位置で又は移動しながら複数回行うことも可能であり、吐出速度、液量なども変更可

能である。剥離すべき未分化コロニーの剥離が完了すると、図１２に示すように、必要に応じてディッシュ４１を傾斜させて、未分化多能性幹細胞を含む液がピペッティング装置４４により回収され、更に継代が必要な場合は、新たな培地を入れたディッシュ４１に分注されることとなる。

【００４７】

ここで、未分化コロニーの剥離を行う場合のピペッティング操作について説明する。図１３に示すように、ピペッティングにより細胞が剥離される範囲の半径をｒとする。近傍に分化コロニーなどの剥離対象となっていないコロニーが存在せず、完全に孤立しているコロニーの場合で、図１４に示すように、ピペッティングにより剥離される半径ｒが剥離されるべきコロニーの半径Ｒより大きい場合には、１回のピペッティングによりコロニー全体を剥離させることができる。また、ピペッティングにより細胞が剥離される範囲の半径ｒが剥離されるべきコロニーの半径Ｒより小さい場合には、図１５に示すように、複数回（図１５では４回）のピペッティングにより未分化コロニー全体の剥離が行われる。その場合の手順は、図１６に示すように、まず、２回のピペッティングにより、未分化コロニー４５の上側半分が剥離され、その状態を確認した後、更に２回のピペッティングにより、未分化コロニー４５の下側半分が剥離されてコロニー全体の剥離が完了する。一方、図１７に示すように、未分化コロニー４５の近傍に分化コロニー４６などが存在する場合は、分化コロニー４６を含む領域４７の部分についてはピペッティングによる剥離を行うことなく、領域４８ａ、領域４８ｂ及び領域４８ｃの３つの領域のみについてピペッティングによる剥離が行われる。

【００４８】

なお、上記では、未分化コロニーのみを剥離させて回収する場合について説明したが、未分化コロニー以外の全てのコロニーを剥離させてピペッティング装置４４を用いてディッシュから除去した後、ディッシュに残った全ての未分化コロニーを一挙に剥離させて回収するように構成することも可能である。また、未分化コロニーの回収と未分化コロニー以外のコロニーの除去とを別々のピペッティング装置を用いて行ってもよい。

【００４９】

更に、本発明においては、広域の撮像画像から各コロニーの位置情報を取得し、その位置情報に基づいてコロニーの拡大画像（位相差相当画像）を撮影し、人手によりその画像を確認、判断することも可能である。また、拡大撮影した画像を元により精度の高いコロニーの選別を自動で行うことも可能である。

【産業上の利用可能性】

【００５０】

本発明のコロニーの識別方法及び装置並びに未分化多能性幹細胞の自動培養方法及び装置によれば、未分化の多能性幹細胞のみを選択的に継代することができるので、再生医療の分野で利用可能である。

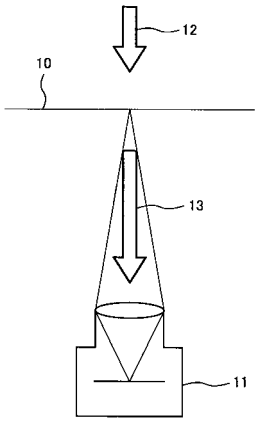
【符号の説明】

【００５１】

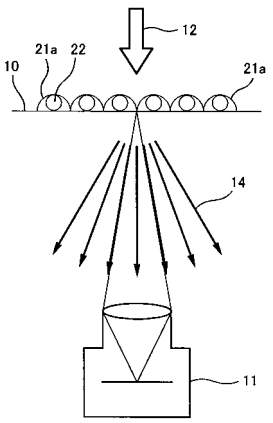
１０　ディッシュ底面
１１　撮像装置
１２　照明光
１３，１４，１５，１６　撮像光
２１ａ　未分化の多能性幹細胞
２１ｂ　分化した多能性幹細胞
２１ｃ　多層に重なった多能性幹細胞
２２　核
４１　ディッシュ
４２　蓋
４３　カメラ
３１　未分化コロニー

３２，３３，３４　分化コロニー
３５，３６　未分化コロニー
３７　分化コロニー
４４　ピペッティング装置
４５　未分化コロニー
４６　分化コロニー
４７　剥離領域
４８ａ，４８ｂ，４８ｃ　剥離領域

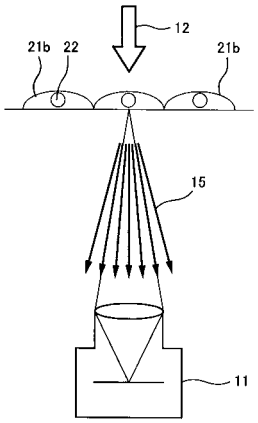
【図１】



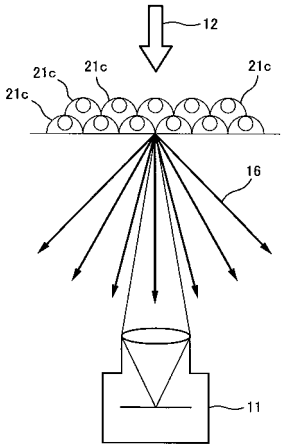
【図２】



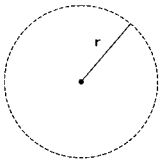
【図３】



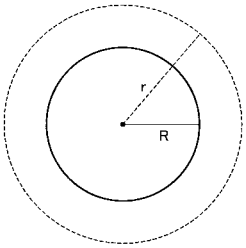
【図４】



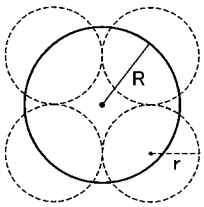
【図１３】



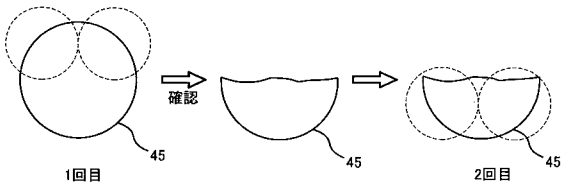
【図１４】



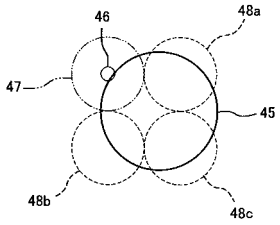
【図１５】



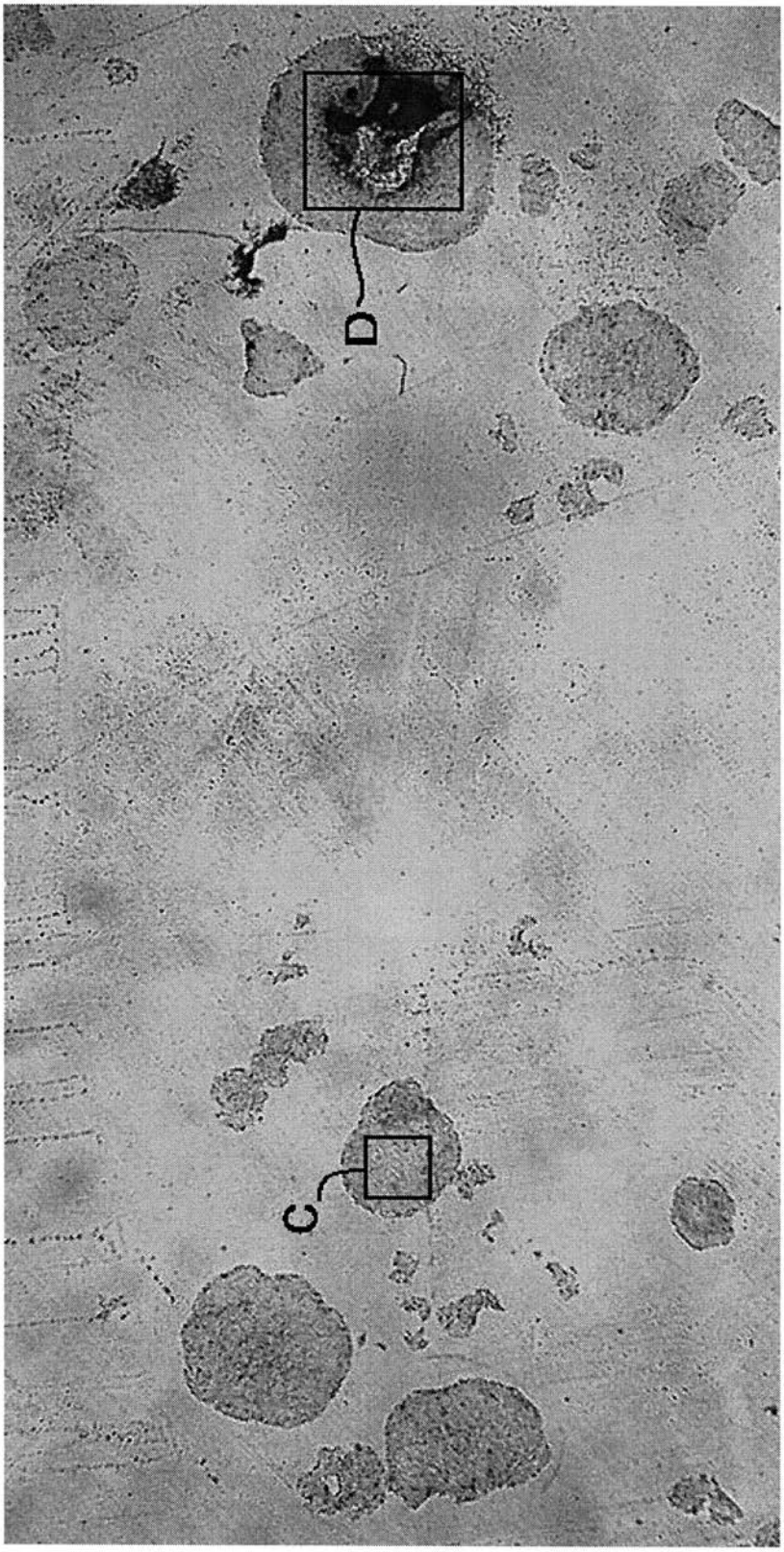
【図１６】



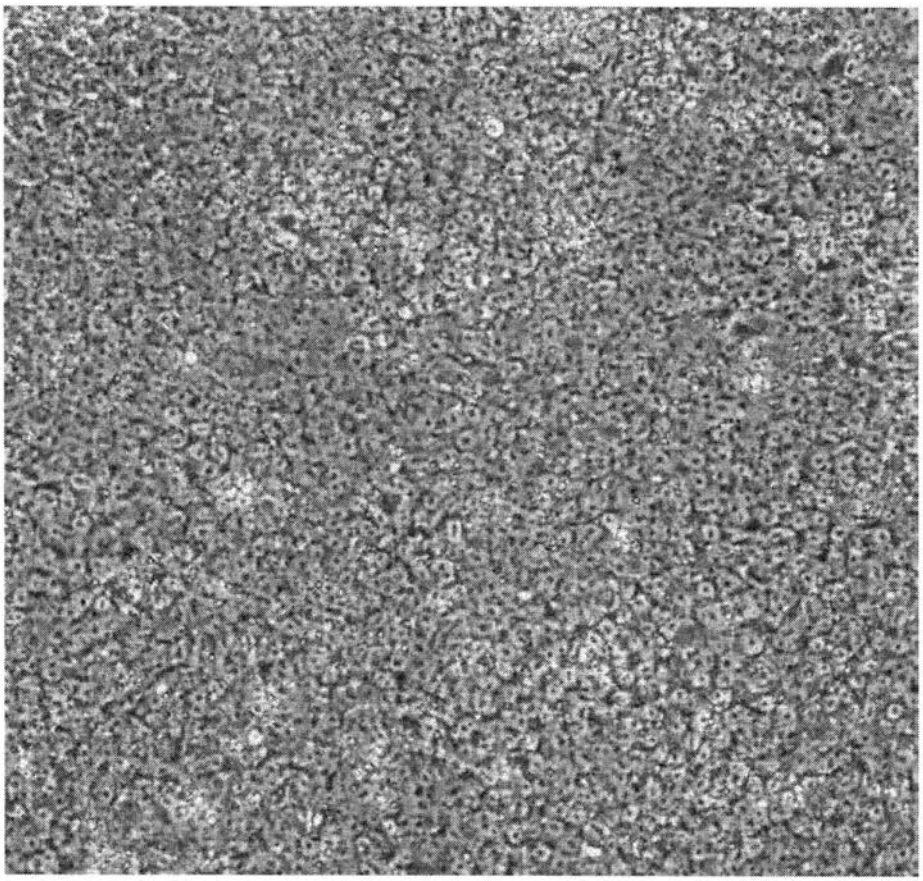
【図１７】



【図５】



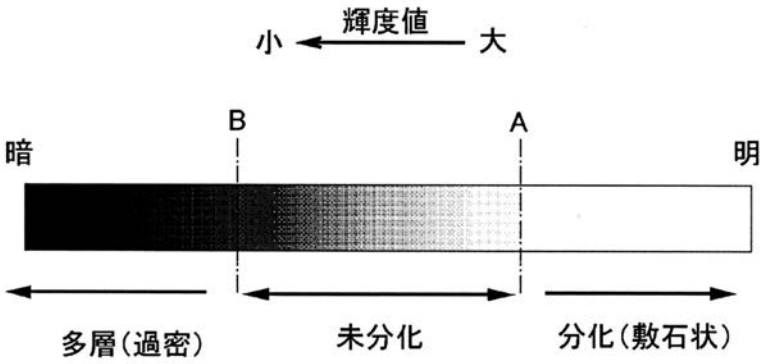
【図６】



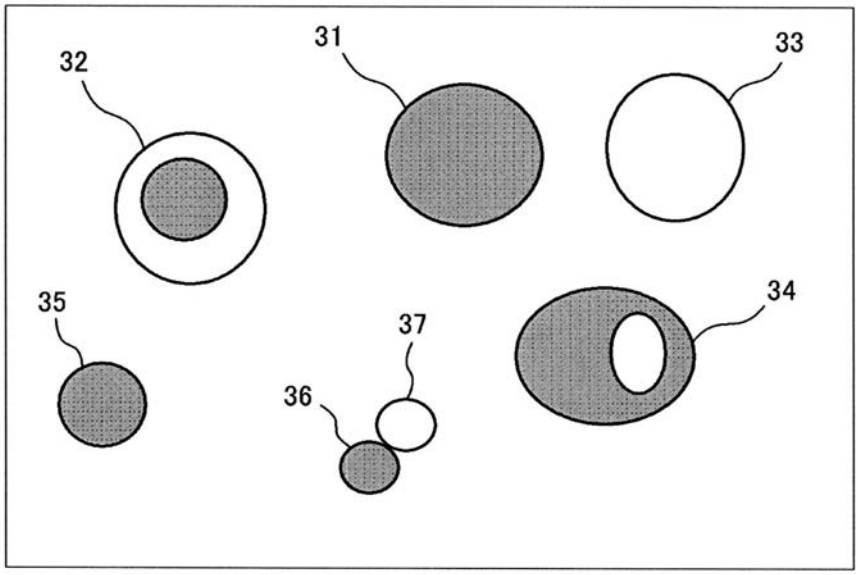
【図７】



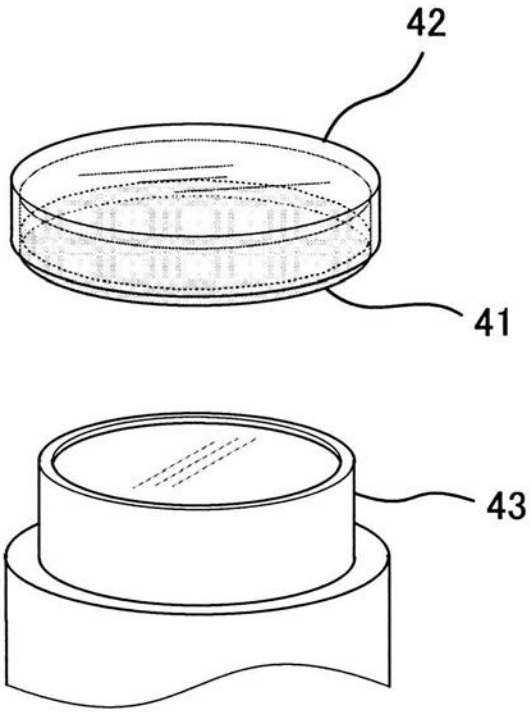
【図８】



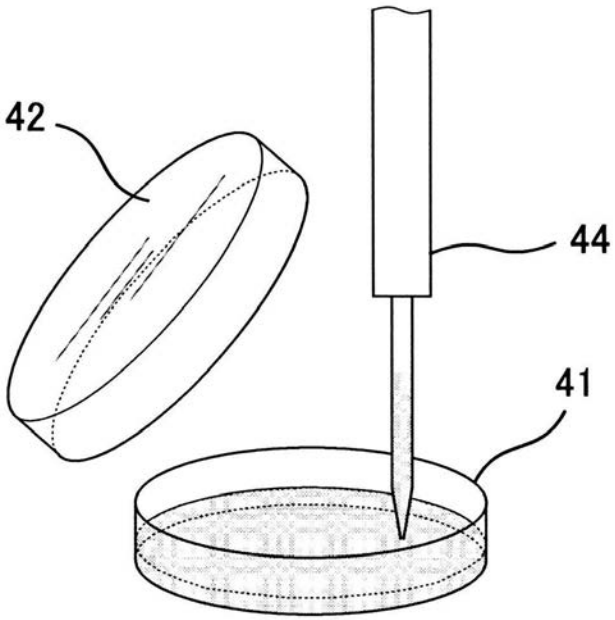
【図９】



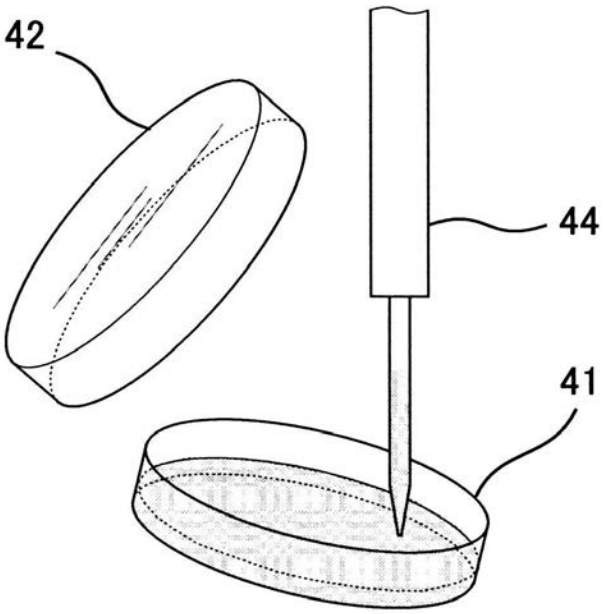
【図１０】



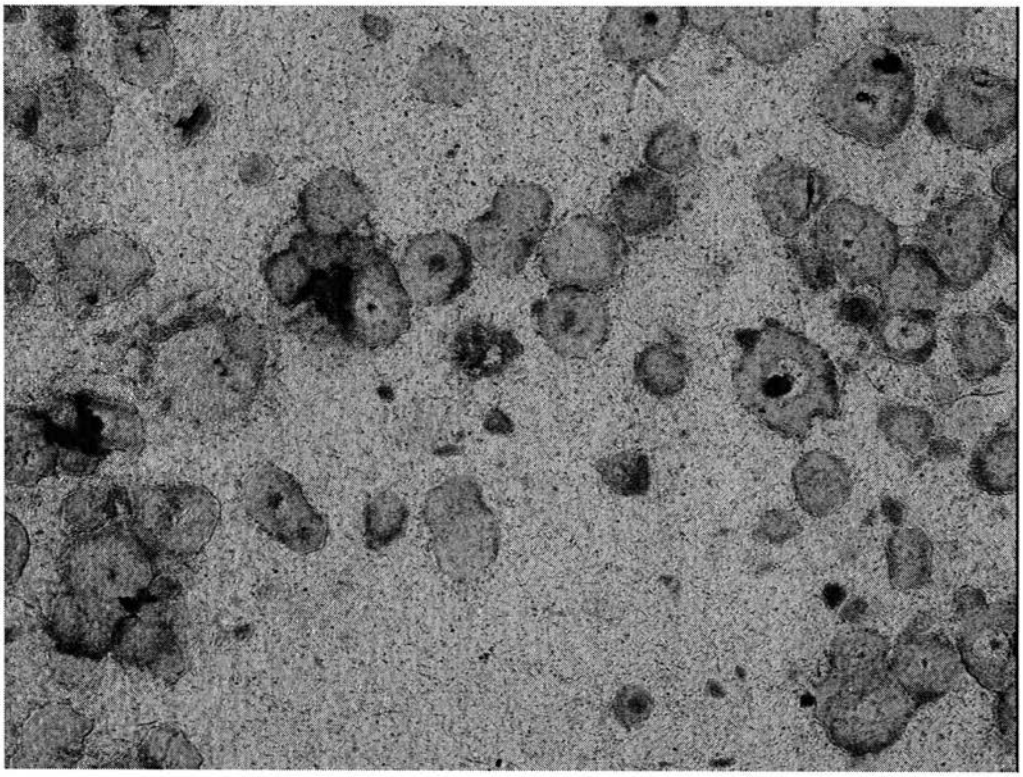
【図１１】



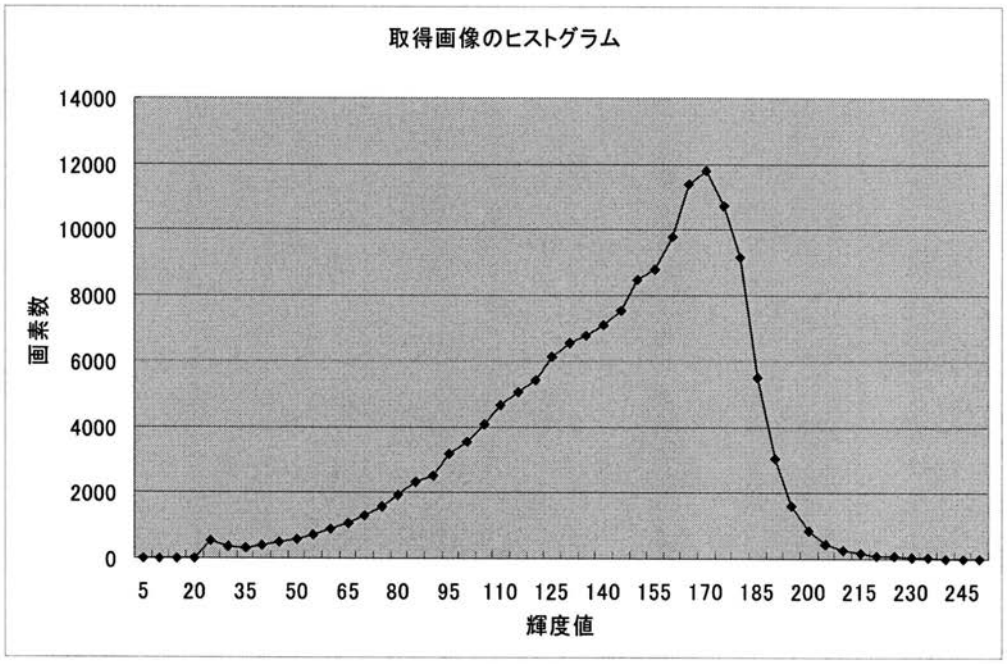
【図１２】



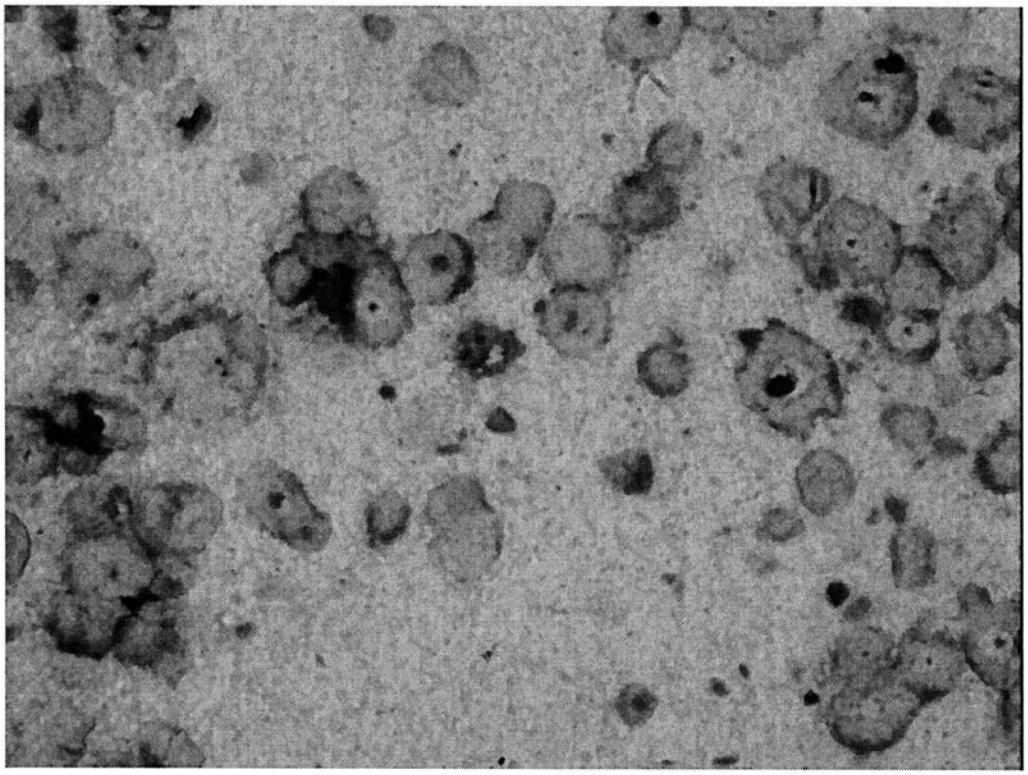
【図１８】



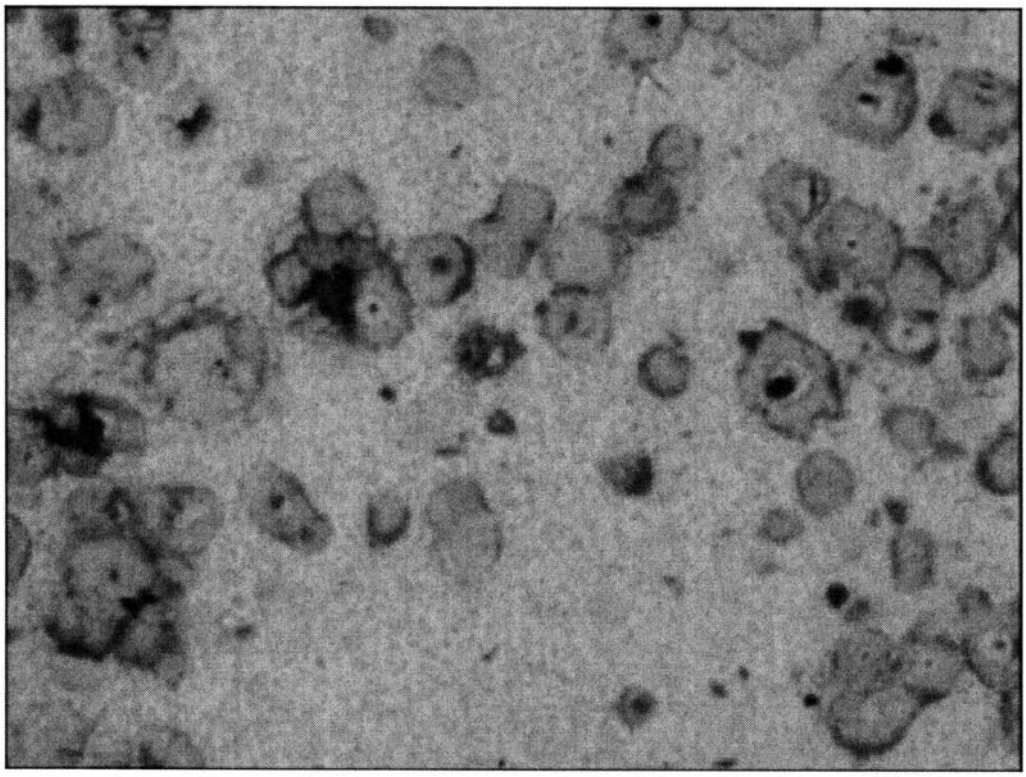
【図１９】


取得画像のヒストグラム
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
画素数
5 20 35 50 65 80 95 110 125 140 155 170 185 200 215 230 245
輝度値

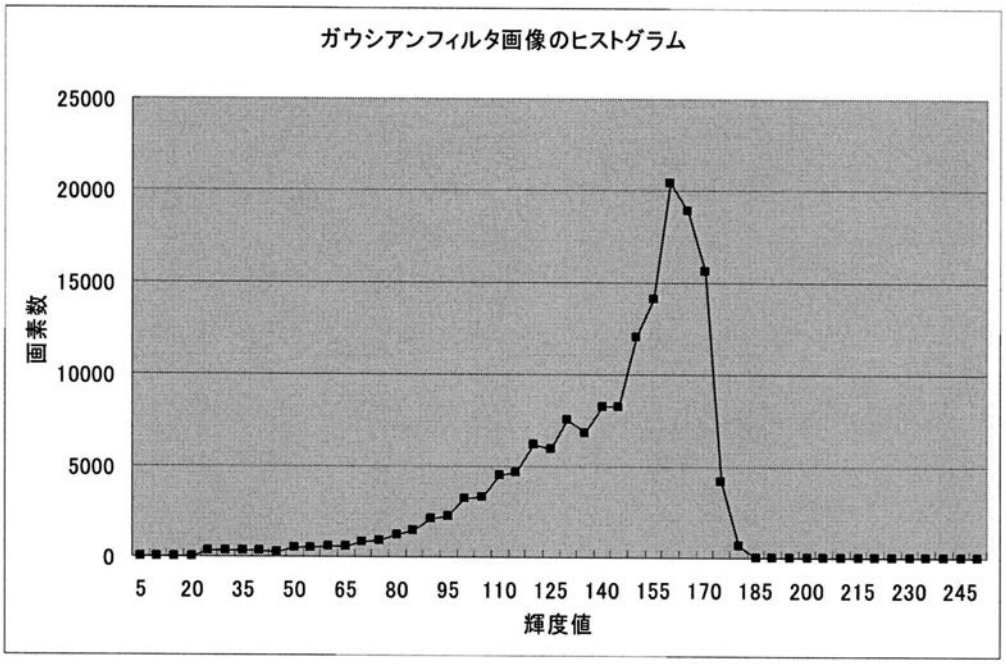
【図２０】



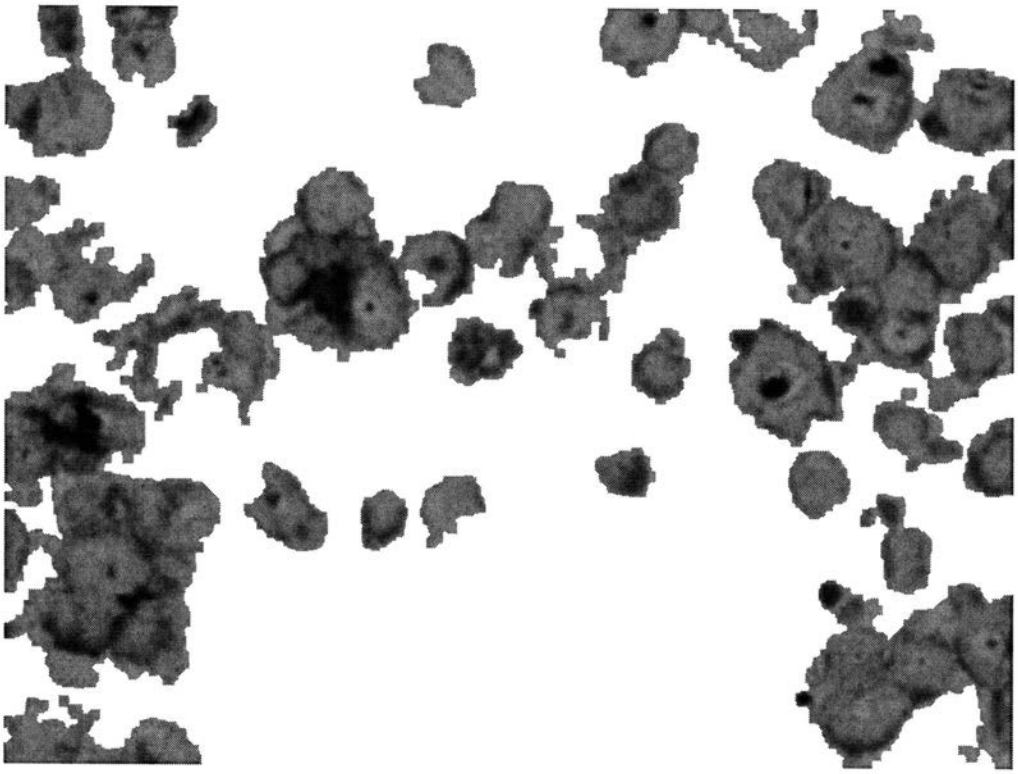
【図２１】



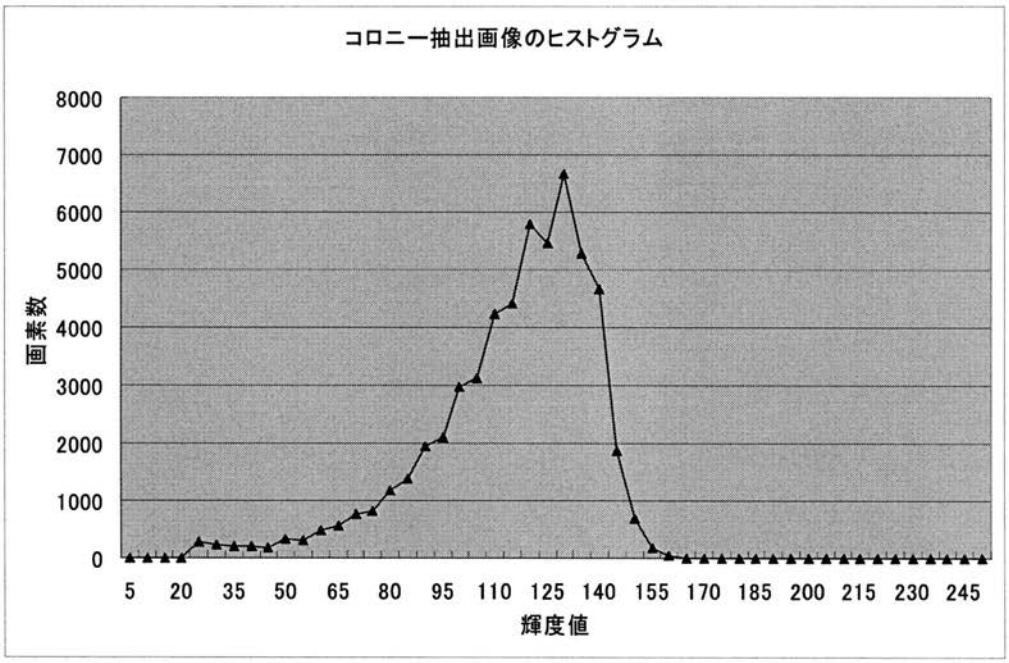
【図２２】


ガウシアンフィルタ画像のヒストグラム
画素数
25000
20000
15000
10000
5000
0
5
20
35
50
65
80
95
110
125
140
155
170
185
200
215
230
245
輝度値

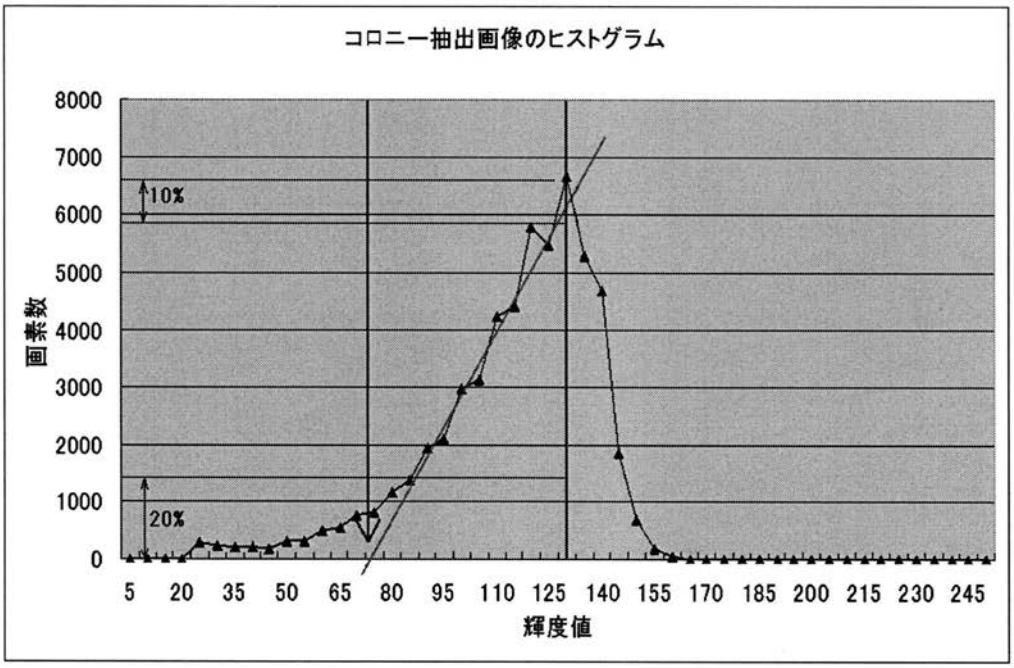
【図２３】



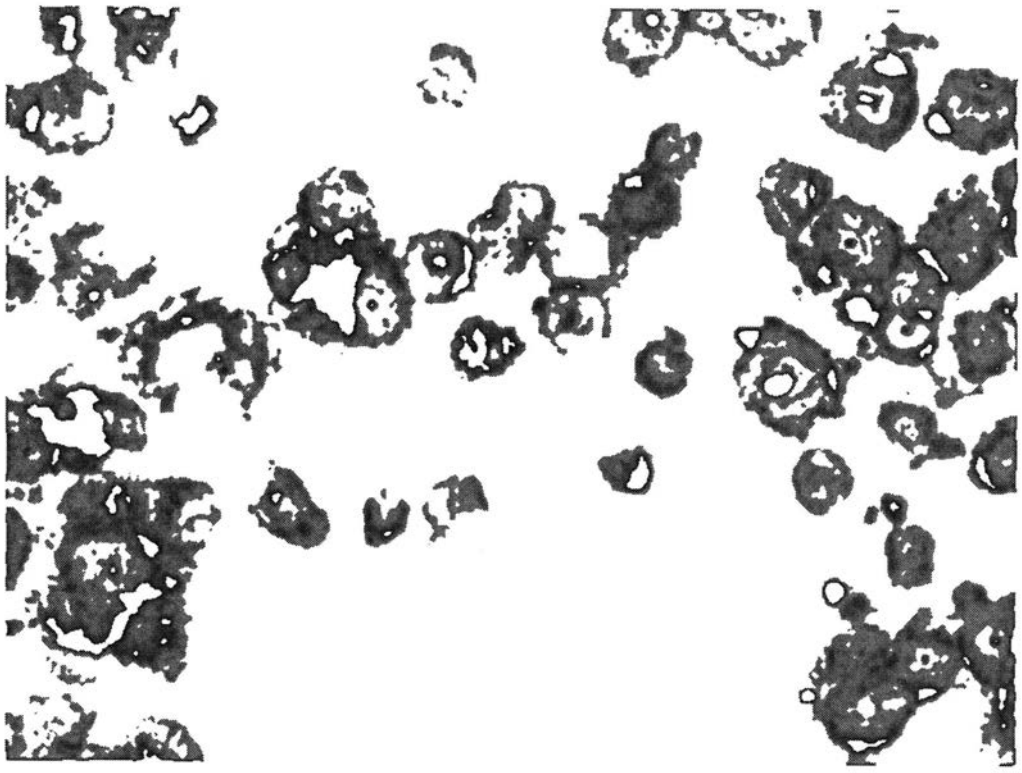
【図２４】


コロニー抽出画像のヒストグラム
画素数
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5 20 35 50 65 80 95 110 125 140 155 170 185 200 215 230 245
輝度値

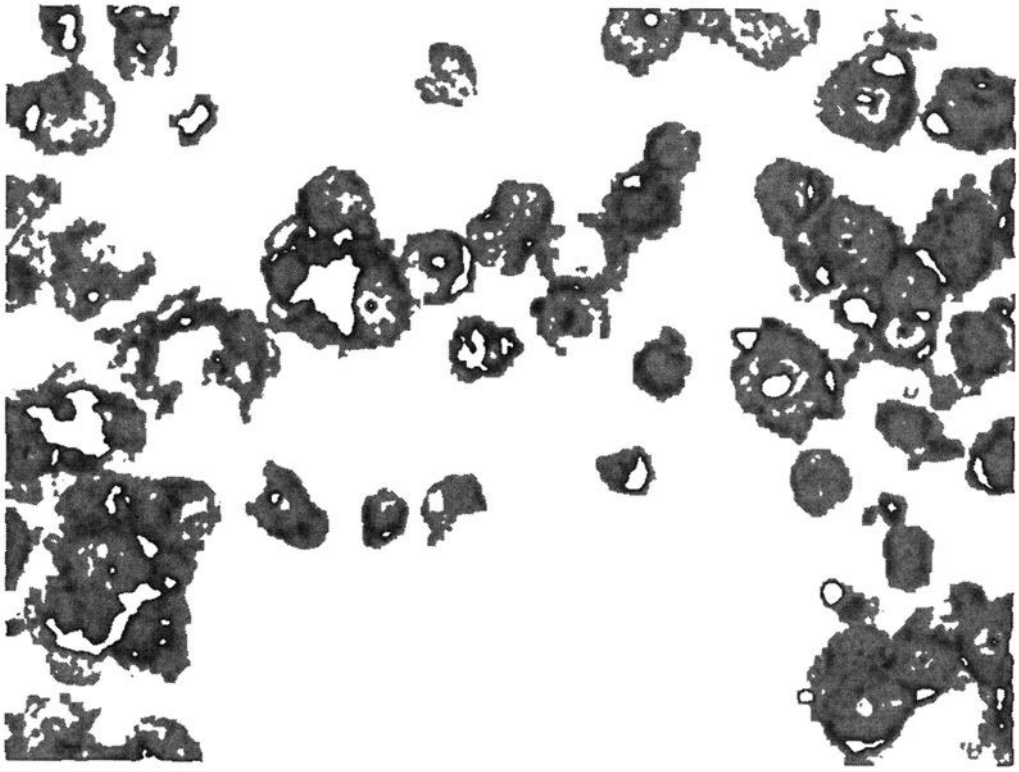
【図２５】


コロニー抽出画像のヒストグラム
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
画素数
10%
20%
5 20 35 50 65 80 95 110 125 140 155 170 185 200 215 230 245
輝度値

【図２６】



【図２７】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/006007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/04(2006.01)i, *C12M1/34*(2006.01)i, *C12M3/00*(2006.01)i, *C12N5/07*(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/04, C12M1/34, C12M3/00, C12N5/07

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)
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Katsumi NAKAJIMA et al., "Saisei Iryo yo Saibo Baiyo no Jidoka Gijutsu", Biotechnology, 2007, vol.85, no.10, pages 432 to 434	1-16
Y	JP 2006-042663 A (ReproCELL Inc.), 16 February 2006 (16.02.2006), entire text (Family: none)	1-16
Y	WO 2008/117813 A1 (Hiroshima University), 02 October 2008 (02.10.2008), entire text & EP 2143791 A1	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 November, 2010 (26.11.10)	07 December, 2010 (07.12.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/006007

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-223791 A (Sysmex Corp.), 13 August 2002 (13.08.2002), entire text & US 2002/086344 A1 & US 7049093 B2 & JP 3929283 B2	1-16
A	JP 2007-522475 A (BECKMAN COULTER INC., US), 09 August 2007 (09.08.2007), entire text & US 2005/176152 A1 & WO 2005/076995 A2 & US 7008792 B2 & EP 1714146 A2	1-16
A	JP 2002-535027 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY), 22 October 2002 (22.10.2002), entire text & WO 2000/042912 A1 & EP 1148811 A1 & US 6404497 B1 & US 2002/171831 A1 & US 6624890 B2	1-16
A	JP 2003-527106 A (THOMAS R A), 16 September 2003 (16.09.2003), entire text & WO 2001/051007 A2 & US 6587792 B1 & US 2004/091906 A1 & EP 1419370 A2	1-16
A	JP 2007-024612 A (Matsushita Ecology Systems Co., Ltd.), 01 February 2007 (01.02.2007), entire text (Family: none)	1-16
A	JP 2009-077635 A (Yokohama City University), 16 April 2009 (16.04.2009), entire text (Family: none)	1-16
A	JP 2009-022284 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND, JP), 05 February 2009 (05.02.2009), entire text & WO 96/031522 A1 & US 5720928 A & EP 871640 A1 & JP 11-503022 A & US 6147198 A & US 6294136 B1 & US 6509158 B1 & US 2003/124611 A1 & US 6610256 B2 & US 7049074 B2 & EP 1914238 A2 & EP 1914238 A3 & US 2003/036067 A1	1-16
A	WO 2009/006422 A1 (CELLULAR DYNAMICS INT INC., US), 08 January 2009 (08.01.2009), entire text & US 2009/029462 A1	1-16

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００６００７

A． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12Q1/04(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

B． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12Q1/04, C12M1/34, C12M3/00, C12N5/07

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）

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、PubMed、CiNii、WPI

C． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	中嶋勝己ら，再生医療用細胞培養の自動化技術，生物工学，2007，第８５巻，第１０号，p.432-434	1-16
Y	JP 2006-042663 A（株式会社リプロセル）2006.02.16，全文 (ファミリーなし)	1-16

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「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の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	国際調査報告の発送日
２６．１１．２０１０	０７．１２．２０１０

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） ４Ｎ ４５０２
白井 美香保
電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３４８８

国際調査報告 | 国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００６００７

Ｃ（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2008/117813 A1 (国立大学法人広島大学) 2008.10.02, 全文 & EP 2143791 A1	1-16
A	JP 2002-223791 A (シスメックス株式会社) 2002.08.13, 全文 & US 2002/086344 A1 & US 7049093 B2 & JP 3929283 B2	1-16
A	JP 2007-522475 A (BECKMAN COULTER INC,US) 2007.08.09, 全文 & US 2005/176152 A1 & WO 2005/076995 A2 & US 7008792 B2 & EP 1714146 A2	1-16
A	JP 2002-535027 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 2002.10.22, 全文 & WO 2000/042912 A1 & EP 1148811 A1 & US 6404497 B1 & US 2002/171831 A1 & US 6624890 B2	1-16
A	JP 2003-527106 A (THOMAS R A) 2003.09.16, 全文 & WO 2001/051007 A2 & US 6587792 B1 & US 2004/091906 A1 & EP 1419370 A2	1-16
A	JP 2007-024612 A (松下エコシステムズ株式会社) 2007.02.01, 全文 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 2009-077635 A (公立大学法人横浜市立大学) 2009.04.16, 全文 (ファミリーなし)	1-16
A	JP 2009-022284 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND,JP) 2009.02.05, 全文 & WO 96/031522 A1 & US 5720928 A & EP 871640 A1 & JP 11-503022 A & US 6147198 A & US 6294136 B1 & US 6509158 B1 & US 2003/124611 A1 & US 6610256 B2 & US 7049074 B2 & EP 1914238 A2 & EP 1914238 A3 & US 2003/036067 A1	1-16

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００６００７

Ｃ（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2009/006422 A1 (CELLULAR DYNAMICS INT INC,US) 2009.01.08, 全文 & US 2009/029462 A1	1-16

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

（出願人による申告）国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成２１年度独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構ｉＰＳ細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発／ｉＰＳ細胞等幹細胞の選別・評価・製造技術等の開発委託研究、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願）

(72)発明者 中嶋 勝己
兵庫県神戸市中央区東川崎町３丁目１番１号 川崎重工業株式会社 神戸工場内

Ｆターム(参考) 4B029 AA01 AA08 AA09 BB11 CC02 FA04 GA01 GB06 HA04 HA07
HA09
4B063 QA18 QQ08 QS39 QX01
4B065 AA90 AC12 BC48 BC50 CA44 CA46

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。