(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009 年 12 月 30 日(30.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/157346 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01) *G06T 1/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/060958

(22) 国際出願日: 2009 年 6 月 16 日(16.06.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2008-168067 2008 年 6 月 27 日(27.06.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス株式会社(OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷２丁目４３番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 館山 清彦 (TATEYAMA, Kiyohiko) [JP/JP].

(74) 代理人: 鈴江 武彦, 外(SUZUYE, Takehiko et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門１丁目１２番９号 鈴榮特許綜合事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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, 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

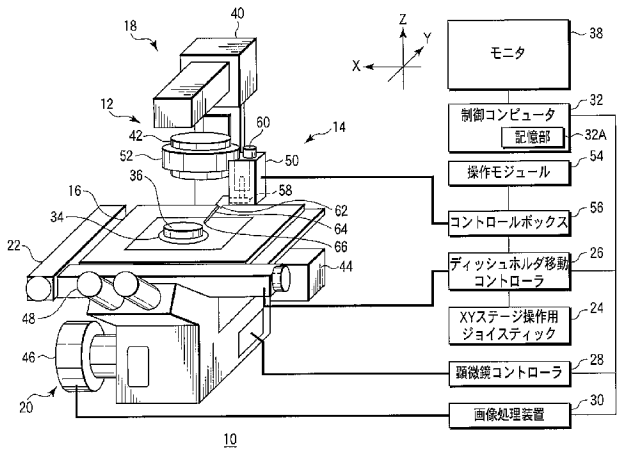
添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2009/157346 A1

(54) **Title**: SYSTEM FOR OPERATING AND OBSERVING CELL

(54) 発明の名称: 細胞操作観察装置

[図1]



24 JOYSTICK FOR XY-STAGE OPERATION
26 CONTROLLER FOR TRANSFERRING DISH HOLDER
28 MICROSCOPE CONTROLLER
30 IMAGE PROCESSOR
32 CONTROLLING COMPUTER
32A MEMORY UNIT
38 MONITOR
54 OPERATION MODULE
56 CONTROL BOX

(57) **Abstract**: In a system for operating and observing a cell (10) whereby a material is introduced into a cell followed by observation, a dish holder (16) carrying a dish (36) for culturing cells placed thereon is transferred in the horizontal direction by the XY-stage (22) of a microscope. Then, a position, which is specified as the position of a cell for conducting material introduction, is located at a definite cell operation position corresponding to the position of a chip part (66) of a chip driver (14) in the visual field of a CCD camera (46). Next, the cell membrane of a cell having been transferred to the cell operation position thus defined is penetrated with the chip part (66) at the front end of a needle (64) serving as a cell operation tool to thereby introduce the material to be introduced, which has been suspended in the liquid culture medium in the dish (16) as described above, into the cell as described above. On the monitor (38), the cell operation range corresponding to the range allowing the cell operation and the position under the observation at the moment are displayed superposed on an image corresponding to the observation range which corresponds to the range of the culture container allowing the observation.

(57) 要約:

[続葉有]

細胞へ物質を導入して観察する細胞操作観察装置１０では、細胞を培養するディッシュ３６を載置するディッシュホルダ１６を顕微鏡ＸＹステージ２２により水平方向に移動して、物質の導入を行う細胞の位置として指定された位置を、ＣＣＤカメラ４６の視野内の、チップ駆動装置１４のチップ部６６の位置に相当する所定の細胞操作位置に配置する。その後、細胞操作ツールとしてのニードル６４先端のチップ部６６により、その所定の細胞操作位置に移動された細胞の細胞膜を穿孔することで、上記ディッシュ１６内の培養液中に混濁させた導入物質を上記細胞に導入する。また、モニタ３８に、観察可能な培養器の範囲である観察範囲に対応する図と、該図に重ね合わせて、細胞操作可能な範囲である細胞操作範囲及び現在観察している位置とを表示する。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞操作観察装置

技術分野

[0001] 本発明は、細胞へ遺伝子等の物質を導入して、その物質が導入された細胞を観察する細胞操作観察装置に関する。

背景技術

[0002] 特許文献１には、操作する細胞を顕微鏡視野下で選定し、その座標値を記録すると共に、基準点２点を設け、座標変換することにより、培養器を再配置しても、導入細胞の位置が再現できる細胞位置教示方法および単一細胞操作支援ロボットが開示されている。これにより、顕微鏡視野内の細胞をモニタ表示を見ながら任意に選定し、細胞操作を行うことができる。

[0003] また、特許文献２には、培養器に対応した図が表示されるとともに、観察中の現在のカメラ位置および移動したい位置、および、過去に観察した位置の記録が表示される培養装置が開示されている。これにより、操作者は、培養器中のどの位置を観察しているのかを、モニタ表示により確認することができる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２００５－３２６３４１号公報

特許文献2：特開２００６－１４１３２６号公報

発明の概要

[0005] 一般的に培養器は、顕微鏡視野範囲に対して大きい領域を有し、また、細胞を溶液中に浸して培養する都合上、周囲が側壁で覆われている。このため、細胞を操作する細胞操作ツール、もしくは、培養器を載置する顕微鏡ステージを不用意に動かすと、細胞操作ツールと培養器とが干渉し、細胞操作ツールを培養器内の細胞にぶつけてしまい、細胞にダメージを与えてしまうことがある。

[0006] しかるに、上記特許文献１の技術では、培養器のごく一部の顕微鏡視野内を表示するのみであるため、操作者が、培養器中のどの位置で細胞操作を行っているのか把握しにくく、細胞操作ツールを細胞にぶつけてしまう危険性がある。

[0007] また、細胞操作を行う際に、干渉することなく安全に操作が行える範囲は、細胞操作ツールの形状、培養器の形状によって異なる。そのため、上記特許文献２の技術のような培養器に対応した図を表示しただけでは、安全に操作が行える範囲を把握しにくく、やはり、細胞操作ツールを細胞にぶつけてしまう危険性が残されている。

[0008] 本発明は、上記の点に鑑みてなされたもので、細胞操作ツールを不用意に細胞にぶつけてしまう危険性を無くすことが可能な細胞操作観察装置を提供することを目的とする。

[0009] 本発明の一態様によれば、細胞へ物質を導入して観察する細胞操作観察装置において、

細胞を培養する培養器を水平方向に移動可能に載置するステージと、

上記ステージに載置された上記培養器内の細胞を撮像して表示する観察手段と、

上記観察手段によって観察可能な培養器の範囲である観察範囲に対応する図と、該図に重ね合わせて、細胞操作可能な範囲である細胞操作範囲及び上記観察手段によって現在観察している位置とを表示する図表示手段と、

上記ステージに載置された上記培養器内の細胞の内、物質の導入を行う細胞の位置を指定する指定手段と、

上記ステージを駆動して、上記指定手段によって指定された位置を上記観察手段の視野内の所定の細胞操作位置に配置する導入位置配置手段と、

上記導入位置配置手段によって上記所定の細胞操作位置に移動された細胞の細胞膜を細胞操作ツールによって穿孔することで、上記培養器内の培養液中に混濁させた導入物質を上記細胞に導入する細胞操作手段と、

を具備する細胞操作観察装置が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、本発明の第１実施例に係る細胞操作観察装置を示す全体構成図である。

[図2]図２は、チップ駆動装置のアダプタの取り付けに関する構成を示す図である。

[図3]図３は、ニードルの構成を示す図である。

[図4]図４は、ニードルの角度による干渉を説明するための図である。

[図5]図５は、可動範囲を説明するための図である。

[図6]図６は、ガラスベースディッシュの上面図及び断面図を示す図である。

[図7]図７は、ガラスベースディッシュの場合の可動範囲を説明するための図である。

[図8]図８は、第１実施例に係る細胞操作観察装置を用いた細胞操作及び観察方法の流れを説明するためのフローチャートを示す図である。

[図9A]図９Ａは、制御コンピュータによる細胞操作・観察動作の制御プログラムを説明するための一連のフローチャートの前半部分を示す図である。

[図9B]図９Ｂは、制御コンピュータによる細胞操作・観察動作の制御プログラムを説明するための一連のフローチャートの後半部分を示す図である。

[図10]図１０は、モニタに表示される操作ウィンドウの一例を示す図である。

[図11]図１１は、チップ部の位置指定を行う際のモニタ表示部の表示例を示す図である。

[図12]図１２は、第１モード細胞導入動作及び第２モード細胞導入動作のフローチャートを示す図である。

[図13]図１３は、本発明の第２実施例に係る細胞操作観察装置におけるＸＹステージ移動指令動作のフローチャートを示す図である。

発明を実施するためのの形態

[0011] 以下、本発明を実施するための形態を図面を参照して説明する。

[0012] ［第１実施例］

本発明の第１実施例に係る細胞操作観察装置１０は、図１に示すように、細胞を観察するための倒立型顕微鏡１２と、それに取り付けられるチップ駆動装置１４と、を含む。

[0013] 倒立型顕微鏡１２は、ディッシュホルダ１６と、照明装置１８と、観察装置２０と、顕微鏡ＸＹステージ２２と、ＸＹステージ操作用ジョイスティック２４と、ディッシュホルダ移動コントローラ２６と、顕微鏡コントローラ２８と、画像処理装置３０と、制御コンピュータ３２と、を備えている。

[0014] ディッシュホルダ１６は、細胞を培養する培養器であるディッシュ３６を載置するθテーブル３４を備える。照明装置１８は、上記ディッシュホルダ１６上の細胞を照明する。観察装置２０は、細胞において反射あるいは透過した光、または細胞から発生した蛍光を観察する。顕微鏡ＸＹステージ２２は、上記ディッシュホルダ１６をＸ方向及びＹ方向に移動する。ＸＹステージ操作用ジョイスティック２４は、操作者が上記顕微鏡ＸＹステージ２２の移動を指示するための操作部材である。ディッシュホルダ移動コントローラ２６は、上記ＸＹステージ操作用ジョイスティック２４からの指示に従って上記顕微鏡ＸＹステージ２２及び上記θテーブル３４を駆動制御する。顕微鏡コントローラ２８は、上記照明装置１８及び上記観察装置２０を制御する。画像処理装置３０は、上記観察装置２０により得られた画像を処理する。制御コンピュータ３２は、上記ディッシュホルダ移動コントローラ２６及び上記顕微鏡コントローラ２８を介して該倒立型顕微鏡１２の全体を制御する。該制御コンピュータ３２には、上記画像処理装置３０により処理された画像を表示するモニタ３８が接続されている。従って、観察装置２０、画像処理装置３０、制御コンピュータ３２及びモニタ３８は、上記ディッシュホルダ１６内の細胞を撮像して表示する観察手段として機能する。また、該制御コンピュータ３２は、各種情報を記憶するための記憶部３２Ａを備えている。

[0015] また、上記照明装置１８には、透過照明光源４０と、コンデンサレンズ４２と、落射照明光源４４と、が備えられている。透過照明光源４０は、細胞

に対して、上記観察装置２０とは反対側から照明光を照射する。コンデンサレンズ４２は、上記透過照明光源４０から発せられた照明光を細胞に集光する。落射照明光源４４は、細胞に対して上記観察装置２０と同一方向から照明光を照射する。

[0016] 一方、上記観察装置２０には、図示しない対物レンズを含む観察光学系と、ＣＣＤカメラ４６と、接眼レンズ４８と、が備えられている。ＣＣＤカメラ４６は、上記観察光学系を介した細胞からの光を撮像して画像を取得する。接眼レンズ４８は、操作者が細胞からの光を直接観察するのに用いられる。

[0017] そして、本実施例に係るチップ駆動装置１４は、装置本体５０と、顕微鏡アダプタ５２と、操作モジュール５４と、コントロールボックス５６と、から構成されている。顕微鏡アダプタ５２は、上記装置本体５０のコンデンサレンズ４２への取り付け部である。操作モジュール５４は、任意の位置に設置可能となっている。コントロールボックス５６は、上記操作モジュール５４の操作者操作に従って装置本体５０を制御する。このコントロールボックス５６は、上記ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して上記制御コンピュータ３２に接続され、該制御コンピュータ３２によって装置本体５０を制御可能に構成されている。また、図１では、装置本体５０を、接眼レンズ４８が設けられた側である倒立型顕微鏡１２の前面側に対し、コンデンサレンズ４２の右側に装着した状態を示している。

[0018] 装置本体５０は、アダプタ保持部５８と、Ｚ駆動部６０と、針位置調整ノブ（図示せず）と、を備えている。アダプタ保持部５８は、アダプタ６２を取り付けるための部材であり、該アダプタ６２は、駆動対象であるチップ部６６を備える細胞操作ツールとしてのニードル６４を装着するための部材である。Ｚ駆動部６０は、上記アダプタ保持部５８をＺ方向に移動することで上記チップ部６６をＺ方向に移動させる。針位置調整ノブは、上記アダプタ保持部５８をＸ方向及びＹ方向に移動することで上記チップ部６６のＸＹ位置を調整する。

[0019] 上記アダプタ保持部５８は、図２に示すように、Ｚ駆動部取付部６８と、装着部材と、嵌合部７０と、を備えている。Ｚ駆動部取付部６８は、当該アダプタ保持部５８を、図示しないＸＹ駆動機構（コントロールボックス５６はこの駆動機構によりアダプタ保持部５８を駆動する）を介して、上記Ｚ駆動部６０の図示しない直線移動機構に取り付けるために使用される。装着部材は、上記アダプタ６２を着脱自在に装着するためのもので、アダプタ保持部５８の上記Ｚ駆動部取付部６８とは長手方向反対側に設けられている。この装着部材は、例えばアダプタ６２が金属製ないしは対応する箇所に金属部を設けたものであればマグネット７２によって構成される。なお、図２において、一点鎖線の右側が装置本体５０内に収容される部分である。即ち、上記マグネット７２は、装置本体５０外部となる位置に設けられている。嵌合部７０は、このマグネット７２の近傍に配設され、上記アダプタ６２の位置決めのために、上記アダプタ６２に設けられた穴や溝に嵌合する。この嵌合部７０は、倒立型顕微鏡１２の前面側に向けて突出しており、アダプタ６２がこの前面側から差し込みにより装着できるようになっている。

[0020] なお、装置本体５０がコンデンサレンズ４２の左側に装着された際にもアダプタ６２を装着できるように、マグネット７２及び嵌合部７０をアダプタ保持部５８の裏面側にも設けても良い。あるいは、装置本体５０の装着位置に応じて、アダプタ保持部５８を交換可能に構成しても良い。

[0021] 上記アダプタ６２に装着されるニードル６４は、図３に示すように、カンチレバーチップ７４と、シャフト７６と、から構成される。カンチレバーチップ７４には、上記チップ部６６が形成されている。シャフト７６は、その先端に上記カンチレバーチップ７４が接着されることで、上記カンチレバーチップ７４を保持している。

[0022] カンチレバーチップ７４は、シリコンプロセスにより製造されるもので、シリコンベース部７８と、可撓性のレバー部８０と、上記チップ部６６と、からなる。シリコンベース部７８は、他の部分つまり上記シャフト７６との接着用の部分である。レバー部８０は、上記シリコンベース部７８から延在

し、例えば厚み２．７μｍ、長さ２４０μｍで２Ｎ／ｍ程度の弾性定数を持つ。上記チップ部６６は、上記レバー部８０の自由端に、該レバー部８０の長手方向に対しておおむね９０度の角度で形成されている。

[0023] 本実施例におけるチップ駆動装置１４では、上記ニードル６４をアダプタ６２に空けられた図示しない穴に挿入・固定し、その後、該ニードル６４を装着したアダプタ６２を装置本体５０に装着するようになっている。こうすることで、基本的に交換品度の高い構成品（消耗品）であるニードル６４を交換することができる。従って、コンタミネーションの虞なく、該チップ駆動装置１４を繰り返し使用することができる。

[0024] また、細長いニードル６４を装置本体５０に直接装着する構成とすると、作業性が悪く、装着作業時にチップ部６６がディッシュホルダ１６等の倒立型顕微鏡１２の何処かに当たって破損してしまう虞がある。本実施例では、装置本体５０から取り外したアダプタ６２にニードル６４を装着した上で、該アダプタ６２を装置本体５０の前面側から装着するようにしているので、そのような破損の虞を少なくすることができる。

[0025] なお、アダプタ６２は、装置本体５０に装着された際に、ニードル６４のシャフト７６を所定の角度で斜め下方に向けて保持するように構成されており、また、カンチレバーチップ７４は、このシャフト７６に対して所定の角度となるように接着されている。また、上記したようにチップ部６６は、レバー部８０の長手方向に対して交差する方向に延びるように設けられている。従って、アダプタ６２が装置本体５０に装着された状態では、チップ部６６は、レバー部８０の自由端において、先端をほぼ鉛直下方に向けて保持されることとなる。

[0026] 上記アダプタ６２がシャフト７６を保持する固定角度については、以下のようにして決められている。即ち、図４に参照符号８２を付して示すように、シャフト７６を起き上げ過ぎると、シャフト７６がコンデンサレンズ４２に干渉してしまう。ニードル６４の長さを例えば約５０ｍｍとすると、シャフト７６を６０度よりも起き上げるとコンデンサレンズ４２に干渉してしま

う。また逆に、シャフト７６を寝かし過ぎると、図４に参照符号８４を付して示すように、シャフト７６がディッシュ３６の周壁部に干渉してしまう。一般に、細胞培養で使用される頻度の高い３５ｍｍガラスボトムディッシュでは、シャフト７６を３０度よりも寝かすとディッシュ３６の周壁部に干渉してしまう。従って、本実施例では、アダプタ６２がシャフト７６を保持する固定角度を、３０度乃至６０度の中間である４５度に設定している。

[0027] アダプタ６２によりシャフト７６を４５度の角度で保持するように設定した場合、図５に一点鎖線で示すような可動範囲８６が得られ、上記３５ｍｍガラスボトムディッシュのガラス面（φ１４ｍｍ程度）に対して、シャフト７６がコンデンサレンズ４２やディッシュ３６の周壁部に干渉することなく、作業が行える。

[0028] このように、アダプタ６２がシャフト７６を保持する固定角度は、コンデンサレンズ４２と使用するディッシュ３６への干渉を考慮して、ニードル６４に十分な可動範囲８６を与えるように決定している。そして、アダプタ６２には、ニードル６４を挿入・固定するため図示しない穴が、この固定角度でシャフト７６を保持するような角度を持って形成されている。

[0029] なお、上記ディッシュ３６として使用されるガラスベースディッシュは、図６に示すように、ポリスチレンなどの合成樹脂材からなる底板部８８と周側部９０とで円筒状に形成されている。その底板部８８の中心部位には、円形を呈する透孔９２が１個穿設されている。上記透孔９２の開口面９６を完全に覆うに足る板状ガラス部９４が、シリコン系接着剤やアクリレート系接着剤などからなる接着剤１００により、上記底板部８８の下面９８側から接合されている。これにより、板状ガラス部９４によって透孔９２の開口面９６の全体が遮蔽されている。こうして、底板部８８と板状ガラス部９４とによって、ディッシュ３６の底部が構成される。

[0030] このような構造を持つディッシュ３６では、図７に示すように、シャフト７６がディッシュ３６の底板部８８に干渉することなくニードル６４を移動させることができる可動範囲８６は、透孔９２の開口面９６よりも狭い範囲

に制限されてしまう。この可動範囲８６は、シャフト７６の径やカンチレバーチップ７４の長さ等によって変化する。なお勿論、θテーブル３４を備えることで、該θテーブル３４を駆動してディッシュ３６を回転させることによって、このディッシュ３６の底板部８８との干渉による制限に関しては回避可能である。

[0031] このように、本実施例に係る細胞操作観察装置１０では、倒立型顕微鏡１２で観察可能な範囲である観察範囲は、細胞が培養されるディッシュ３６の透孔９２の開口面９６全体である。これに対して、チップ駆動装置１４によって細胞操作可能な範囲である細胞操作範囲は、上記可動範囲８６となる。従って、本実施例に係る細胞操作観察装置１０では、観察範囲と細胞操作範囲とが異なることとなる。

[0032] 一方、チップ駆動装置１４の操作モジュール５４は、特に図示しないが、Ｚ値セットボタンを備えている。このＺ値セットボタンは、Ｚ方向任意の位置を記憶する指示を行うためのボタンである。上記Ｚ駆動部６０によるアダプタ保持部５８のＺ方向への駆動操作を該操作モジュール５４で行っても、このＺ値セットボタンにより記憶された位置よりも下（ディッシュ３６内の細胞の方向）にはアダプタ保持部５８が下降しないようにすることができる。なお、このＺ値セットボタンは、ラッチ機構を備えており、操作者が押下操作即ちＯＮ操作すると、再度押下操作されるまで、その押下状態即ちＯＮ状態を維持する。以降、Ｚ値セットボタンがＯＦＦ状態を「第１モード」と呼び、ＯＮ状態を「第２モード」と呼ぶものとする。

[0033] 以下、このように構成された本実施例に係る細胞操作観察装置１０を用いた細胞操作及び観察方法について説明する。

[0034] ここでは、ディッシュ３６内の培養液中で培養される細胞に物質を導入する場合及びそのようにして物質が導入された細胞の観察を例に説明する。

[0035] まず、細胞に物質を導入する場合について説明する。

即ち、図８に示すように、該細胞操作観察装置１０の操作者は、まず、細胞操作を行うためのチップ駆動装置１４の準備が済んでいるかどうか確認す

る（ステップＴＳ１）。ここで、未だ準備が済んでいない場合には、装置本体５０から取り外されているアダプタ６２に、ニードル６４を差し込み装着する（ステップＴＳ２）。そして、顕微鏡アダプタ５２を介してコンデンサレンズ４２に装着されている装置本体５０のアダプタ保持部５８に対し、倒立型顕微鏡１２の前面側から、そのニードル６４が装着されたアダプタ６２を装着する（ステップＳＴ３）。

[0036] その後、チップ位置決めを行う（ステップＳＴ４）。即ち、操作者は、接眼レンズ４８又はモニタ３８で観察しながら、図示しない針位置調整ノブを操作して、目視により、ニードル６４の先端に形成されているチップ部６６の位置を、図示しない対物レンズの中央位置（視野中央位置）に設定する。これは、ディッシュホルダ１６上にディッシュ３６を載置せずに行う。

[0037] こうしてチップ位置決めがなされたならば、あるいは、上記ステップＳＴ１でチップ駆動装置１４が準備済であると確認した場合には、操作者は、次に、ディッシュホルダ１６上へのディッシュ３６の載置を行う（ステップＳＴ５）。なお、ディッシュ３６は、当該ディッシュ３６内の培養液中で培養される細胞に物質を導入するために、その導入しようとする物質を培養液に混濁した状態でセットされる。

[0038] そして、モニタ３８に表示された画像を確認しながらＸＹステージ操作用ジョイスティック２４や操作モジュール５４を操作して細胞操作・観察動作を実施することで、ディッシュ３６内の所望の細胞に対して物質を導入する（ステップＳＴ６）。この細胞操作・観察動作は、操作者の上記操作に応じて制御コンピュータ３２が、ディッシュホルダ移動コントローラ２６、顕微鏡コントローラ２８及びコントロールボックス５６を介して、倒立型顕微鏡１２及びチップ駆動装置１４の各部を駆動制御することで行われるものであり、その詳細については後述する。

[0039] そして、細胞への物質導入が終了したならば、ディッシュ３６を回収する（ステップＳＴ７）。

[0040] また、続けて別のディッシュ３６にて培養された細胞に対して物質を導入

する場合には、上記動作を繰り返すこととなる。この場合、既にチップ駆動装置１４の準備が済んでいるので、上記ステップＳＴ１から上記ステップＳＴ５へ進むことができる。勿論、コンタミネーションの虞をなくすために、上記ステップＳＴ１から上記ステップＳＴ５に進むのではなく、上記ステップＳＴ２に進んで、ニードル６４を交換するようにしても良い。

[0041] 上記ステップＳＴ７で回収されたディッシュ３６は、上記導入しようとする物質が混濁された培養液が洗い流されて、新たな培養液が補充される。これにより、物質が導入された細胞が上記ディッシュ３６内で更に培養される。そして、所定の期間をおいた後、細胞操作観察装置１０を用いて観察される。

[0042] この観察を行う場合には、チップ駆動装置１４は必要としないので、上記ステップＳＴ１から上記ステップＳＴ５に進む。そこで、操作者は、その観察しようとする物質導入済細胞を培養しているディッシュ３６を、顕微鏡ＸＹステージ２２によって水平方向に移動されるディッシュホルダ１６上へ載置する。

[0043] そして、操作者は、モニタ３８に表示された画像を確認しながらＸＹステージ操作用ジョイスティック２４や操作モジュール５４を操作して細胞操作・観察動作を実施することで、ディッシュ３６内の所望の細胞を観察する（ステップＳＴ６）。

[0044] そして、細胞の観察が終了したならば、ディッシュ３６を回収する（ステップＳＴ７）。

[0045] 次に、上記ステップＳＴ６の細胞操作・観察動作を説明する。

[0046] この細胞操作・観察動作は、制御コンピュータ３２において、図９Ａ及び図９Ｂに示すような動作を行う制御プログラムを実行することで実施される。

[0047] なお、該制御プログラムが起動されると、図１０に示すような操作ウィンドウ１０２がモニタ３８に表示される。この操作ウィンドウ１０２は、メニューバー１０４と、モニタ表示部１０６と、操作部１０８と、培養器マップ

表示部１１０と、を有している。モニタ表示部１０６は、ＣＣＤカメラ４６で取得され画像処理装置３０により処理された画像を表示する領域である。操作部１０８は、各種操作ボタンやリスト表示を行う領域である。培養器マップ表示部１１０は、モニタ表示部１０６がディッシュホルダ１６に載置されたディッシュ３６のどの部分を表示しているのかを示す領域である。

[0048] 上記操作部１０８は、操作ボタンとして、「導入」ボタン１１２、「針設定モード」ボタン１１４、「導入ポイント登録」ボタン１１６、「操作エリア登録」ボタン１１８、「座標変換」ボタン１２０、「基準点クリア」ボタン１２２、「観察」ボタン１２４、等を含む。「導入」ボタン１１２は、物質の導入を指示するためのボタンである。「針設定モード」ボタン１１４は、チップ部６６の位置登録を指示するためのボタンである。「導入ポイント登録」ボタン１１６は、物質を導入する位置の登録を指示するためのボタンである。「操作エリア登録」ボタン１１８は、物質を導入する細胞を含むエリアの登録を指示するためのボタンである。「座標変換」ボタン１２０は、ディッシュ３６の基準点の登録を指示するためのボタンである。「基準点クリア」ボタン１２２は、登録した基準点のクリアを指示するためのボタンである。「観察」ボタン１２４は、観察を行うことを指示するためのボタンである。

[0049] 更に、操作部１０８は、導入細胞リスト１２６を含む。この導入細胞リスト１２６は、制御コンピュータ３２の記憶部３２Ａに構成された導入細胞リストの内容を表示するものである。この導入細胞リストは、上記「導入ポイント登録」ボタン１１６のマウスクリック操作に応じて、細胞個々の導入細胞情報が登録される。ここで、導入細胞情報は、位置情報（ＸＹ座標）と、導入物質情報と、を含む。導入物質情報は、モニタ表示部１０６への表示色、物質名称、粒子のサイズ、濃度、観察条件、等を含む。なお、導入する物質としては、細胞核、細胞質の何れに導入するものであっても良い。例えば、遺伝子、色素、量子ドットなどの蛍光試薬、イオン、ペプチド、タンパク質、多糖類、等、ディッシュ３６内に混濁できるものであれば構わない。こ

れらの導入する物質を導入物質リスト１２８よりプルダウンリストで選択可能なように、予め登録しておくことが好ましい。このような導入細胞リスト１２６を表示することで、細胞個々に、導入内容が把握できるようになる。

[0050] 更に、操作部１０８は、操作エリアリスト１３０を含む。この操作エリアリスト１３０は、制御コンピュータ３２の記憶部３２Ａに構成された操作エリアリストの内容を表示するものである。この操作エリアリストは、上記「操作エリア登録」ボタン１１８のマウスクリック操作に応じて、操作エリア情報が登録される。この操作エリア情報は、物質の導入を行う又は行った細胞を含むエリアの位置情報、例えば当該エリアの左上等の所定のポイントのＸＹ座標を含む。なお、操作エリアのサイズは、モニタ表示部１０６に表示されている範囲に相当する。

[0051] 一方、培養器マップ表示部１１０は、観察範囲１３２と、細胞操作範囲１３４とを、区別可能に表示する。ここで、観察範囲１３２は、細胞が培養されるディッシュ３６の透孔９２の開口面９６全体に相当する、倒立型顕微鏡１２で観察可能な範囲に対応する図である。細胞操作範囲１３４は、上記観察範囲１３２の内のチップ駆動装置１４によって細胞操作可能な範囲である。また、培養器マップ表示部１１０は、モニタ表示部１０６が表示しているエリアつまり現在観察している位置を現在位置１３６として呈示し、更に、上記操作エリアリスト１３０に登録表示されている各エリアを細胞操作エリア１３８として表示する。

[0052] このように、図表表示手段としての培養器マップ表示部１１０において、観察可能なディッシュ３６の範囲である観察範囲１３２と、細胞操作可能な範囲である細胞操作範囲１３４及びモニタ表示部１０６で現在観察している位置である現在位置１３６とを、重ね合わせて表示する。こうすることで、現在位置が細胞操作範囲１３４を外れないように、細胞操作ツールとしてのシャフト６４もしくはディッシュ３６を載置する顕微鏡ＸＹステージ２２を操作可能となるので、シャフト６４を不用意に細胞にぶつけてしまう危険性を無くすことが可能となる。また。現視野の観察像を表示するモニタ表示部

１０６と、培養器マップ表示部１１０とを、同一の画面（操作ウィンドウ１０２）上で表示するので、今現在何処を観察しているのかを容易に把握できるようになる。

[0053] そして、制御コンピュータ３２は、まず、このような操作ウィンドウ１０２におけるメニューバー１０４の「ファイル」項目のマウスクリック操作等で表示されるファイルメニューより新規ファイル作成が選択されたか否かを判別する（ステップＳ１１）。

[0054] ここで、新規ファイル作成が選択された場合には、別途、図示しないサンプル情報入力ウィンドウを開き、サンプル情報の入力を受け付け、その入力されたサンプル情報を記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ１２）。このサンプル情報としては、日付、番号、細胞、等が含まれる。更に、ディッシュ３６の種類やチップ駆動装置１４の種類をプルダウンメニューから選択できるようになっている。

[0055] こうしてサンプル情報が入力されたならば、次に、導入物質リスト１２８のプルダウンリストから導入物質の選択がなされる（ステップＳ１３）。このとき、上記導入細胞リスト１２６やモニタ表示部１０６で識別表示するための表示色の設定や、物質名称、粒子のサイズ、濃度、観察条件等の入力が可能となっている。観察条件を入力しておくことにより、物質導入された細胞を後で観察しようとしたときに、その都度、観察条件を設定する必要を無くすことができる。このような導入物質の情報も記憶部３２Ａに一時記憶される。

[0056] その後、ディッシュホルダ移動コントローラ２６により顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動してディッシュホルダ１６を水平方向に移動させ、ディッシュ３６の外形を測定することで観察範囲及び細胞操作範囲を設定し、それらを記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ１４）。例えば、観察範囲は、上記入力されたディッシュ３６の種類に基づいて、ディッシュ３６が円形であれば外周の３点、四角形であれば対角の２点を測定すれば、特定できる。なお、この測定は、画像処理によってＣＣＤカメラ４６で取得し画像処理装置

３０で画像処理した画像より境界を検出することで自動的に行うことも可能であるし、操作者がＸＹステージ操作用ジョイスティック２４を操作して上記２点又は３点を指定するようにしても良い。即ち、ディッシュホルダ移動コントローラ２６、制御コンピュータ３２、ＣＣＤカメラ４６、画像処理装置３０、等は、顕微鏡ＸＹステージ２２に載置されたディッシュ３６の形状を測定する測定手段として機能する。このようにディッシュ３６の形状を測定することで、容易に観察範囲を設定できる。

[0057] また、制御コンピュータ３２の記憶部３２Ａには、ディッシュ３６の種類とチップ駆動装置１４の種類との組み合わせに応じた細胞操作範囲のリストが予め記憶されている。従って、上記指定され一時記憶したディッシュ３６の種類及びチップ駆動装置１４の種類に応じて、細胞操作範囲を該記憶部３２Ａより読み出して設定することができる。

[0058] このようにして、容易に観察範囲及び細胞操作範囲を設定できるので、それら設定した観察範囲及び細胞操作範囲と、モニタ表示部１０６が表示している現在位置とを、培養器マップ表示部１１０に、観察範囲１３２、細胞操作範囲１３４及び現在位置１３６としてそれぞれ表示する（ステップＳ１５）。

[0059] 次に、基準位置の登録を受け付け、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ１６）。これは、操作者が図示しないカーソルをモニタ表示部１０６の所望位置に合わせてマウスクリック操作により位置を指定して、「座標変換」ボタン１２０を操作すると、そのボタン操作に応じて上記指定位置を基準位置として登録するものである。この基準位置は２点、登録される。この登録された基準位置は、一旦回収された当該ディッシュ３６を再度セットして観察する際の位置合わせ（座標変換やθテーブル３４での回転駆動）に使用される。

[0060] その後、操作者の操作モジュール５４操作に応じて、コントロールボックス５６を介してチップ駆動装置１４のＺ駆動部６０を作動させ、チップ部６６を細胞の上方から細胞に近接させていく（ステップＳ１７）。操作者は、

こうして、チップ部６６をディッシュ３６内の細胞と同焦で観察可能な位置まで降下させる。

[0061] そして、チップ部６６の位置を記憶部３２Ａに登録する（ステップＳ１８）。これは、操作者が、「針設定モード」ボタン１１４を操作した後、図１１に示すように、カーソル１４０を、モニタ表示部１０６に表示されたカンチレバーチップ７４の画像（カンチレバーチップ像１４２）の先端部に合わせて、マウスクリック操作することでチップ部６６の位置を指定すると、そのマウスクリック操作に応じて上記指定位置をチップ部６６の位置として登録するものである。このようにして、チップ部６６の位置を登録することができる。また、再度同様の操作を行うことで、迅速に位置の修正が行える。このように、制御コンピュータ３２は、所定の細胞操作位置を設定する設定手段として機能する。

[0062] なお、操作者の位置指定を受ける代わりに、「針設定モード」ボタン１１４の操作に応じて、制御コンピュータ３２が画像処理によりカンチレバーチップ像１４２の幾何学的形状により自動判別するようにしても構わない。即ち、カンチレバーチップ７４の幾何学的形状から、細胞内にチップ部６６を侵入させなくてもチップ部６６の位置が容易に判別できる。

[0063] 上述したように、チップ駆動装置１４のシャフト７６が傾きを持って設置されているので、チップ部６６の位置を正確に検出することが難しい。また、チップ部６６が細胞内に侵入時にも、たわみによるズレ、破損による変化が生じるので、上記所定の細胞操作位置であるチップ部６６の位置を都度、修正する必要がある。本実施例では、操作者の指定操作によって又はカンチレバーチップ７４の幾何学的形状から自動判別によって、チップ部６６の位置を手間無く設定することができる。

[0064] その後、物質を導入する位置の指定を受け付ける（ステップＳ１９）。これは、操作者がモニタ表示部１０６上で導入する細胞を選定し、カーソル１４０をその選定した細胞内の導入したい位置に重ね合わせ、マウスクリック操作すると、制御コンピュータ３２が、その操作に応じて上記位置を指定位

置として受け付けるものである。このように、制御コンピュータ３２は、ディッシュホルダ１６内の細胞の内、物質の導入を行う細胞の位置を指定する指定手段としても機能する。より具体的には、この細胞の選定は、操作者が、モニタ表示部１０６の画像を見ながら、次のように行なう。即ち、ＸＹステージ操作用ジョイスティック２４を操作してディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動することで、ディッシュ３６をチップ駆動装置１４によって細胞導入を行う所定の細胞操作位置に移動させる。この際、操作者は、培養器マップ表示部１１０における細胞操作範囲１３４及び現在位置１３６の表示を確認しながらＸＹステージ操作用ジョイスティック２４を操作することで、シャフト７６をディッシュ３６にぶつけてしまうことを防止できる。

[0065] また、フローチャートには示していないが、次のような指定方法も採ることができる。即ち、まず、上記のようにディッシュ３６を移動させて「操作エリア登録」ボタン１１８の操作により細胞操作エリアを記憶部３２Ａに設けた操作エリアリストに登録するという操作を繰り返す。その後、該記憶部３２Ａの操作エリアリストの内容を表示している操作エリアリスト１３０上で所望の細胞操作エリアを選択してマウスダブルクリック操作により指定することで、当該細胞操作エリアの位置を細胞操作エリア１３８としてモニタ表示部１０６に表示させる。そして、その表示された細胞操作エリア１３８内から、導入しようとする細胞を選定する。

[0066] 次に、制御コンピュータ３２は、チップ部６６の位置と上記指定位置との相対位置を算出し、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動して、上記指定位置がチップ部６６の位置と重なる位置にディッシュ３６を移動する（ステップＳ２０）。このように、制御コンピュータ３２及びディッシュホルダ移動コントローラ２６は、顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動して、上記指定された位置を上記所定の細胞操作位置に配置する導入位置配置手段として機能する。

[0067] その後の動作は、Ｚ値をセットしているか否かにより異なる。

１回目のチップ駆動では、まだＺ値をセットしていないので（ステップＳ２１）、第１モード細胞導入動作を行う（ステップＳ２２）。

[0068] この第１モード細胞導入動作においては、図１２に示すように、チップ部６６をＺ方向に微少量ずつ下降させていき、Ｚ方向の最適位置を決める（ステップＳ２２Ａ）。これは、操作者が、モニタ表示部１０６の画像を観察して「細胞の歪み」または「レバー部８０の撓み」を確認しながら、操作モジュール５４を操作し、制御コンピュータ３２は、その操作に応じてコントロールボックス５６を介してＺ駆動部６０を駆動することで行なわれる。このとき、操作モジュール５４の操作は、該操作モジュール５４に設けられた図示しない移動量設定ダイアルの大・中・小でその感度を適宜切り替えながら行うことなる。また、操作モジュール５４の操作ではなく、図１０に示すように、操作部１０８に「ステップ下降」ボタン１４４及び「ステップ上昇」ボタン１４６とステップ量設定部１４８を設け、それらのマウスクリック操作によってＺ駆動部６０の駆動方向と駆動量を指示するようにしても良い。

[0069] そして、このようにしてチップ部６６を下降させディッシュ３６の底面へ近づけていき、チップ部６６の先端が下降していく途中において、ディッシュ３６内の細胞に接触する。ここで、更にチップ部６６を下降させていくと、チップ部６６の先端が細胞内、即ち、細胞膜に及び核位置であれば核に、孔または傷をつける。こうして形成された孔または傷に、ディッシュ３６内に混濁された物質を流通することにより、物質が細胞内に流入する。導入しようとする粒子のサイズ等によっては、孔または傷をつけなくてもチップ部６６で細胞を変形させることによる物理的刺激でストレッチレセプター等に結合されたチャンネルが開くことによっても流入する。このとき、操作者が操作モジュール５４の図示しないＺ値セットボタンを押す。制御コンピュータ３２は、そのボタン押下に応じて（ステップＳ２２Ｂ）、図示しない位置検出部で検出されるそのときのアダプタ保持部５８の位置を、最適位置を示すＺ値として、記憶部３２Ａに記憶する（ステップＳ２２Ｃ）。

[0070] その後、操作モジュール５４の操作に応じて、ニードル６４を上昇させる

ことで、チップ部６６を退避させる（ステップＳ２２Ｄ）。

[0071] なお、チップ部６６を上昇させてチップ部６６を細胞から引き抜いた後は、ある一定時間が経過すると、細胞膜は自己修復により回復し、細胞内に物質が取り込まれた状態となる。

[0072] 以上のように、チップ駆動装置１４、制御コンピュータ３２、操作モジュール５４、及びコントロールボックス５６は、上記所定の細胞操作位置に移動された細胞の細胞膜を穿孔することで、上記ディッシュホルダ１６内の培養液中に混濁させた導入物質を上記細胞に導入する細胞操作手段として機能する。

[0073] こうして物質が細胞に導入された後、操作者は「導入ポイント登録」１０４ボタンのマウスクリック操作を行なう。これに応じて、制御コンピュータ３２は、チップ部６６の位置に対応する顕微鏡ＸＹステージ２２の座標値（導入位置情報）及び導入物質情報を、記憶部３２Ａに設けた導入細胞リストの導入ポイントＮｏ．１の情報に登録する（ステップＳ２２Ｅ）。その登録内容は、操作部１０８に導入細胞リスト１２６として表示される。即ち、導入細胞リスト１２６は、指定された位置を示す細胞の位置情報（導入位置情報）と導入物質を示す導入物質情報とを含む導入細胞情報を表示する表示手段として機能する。このように、細胞の位置情報と導入物質情報を表示するようにしたことにより、どの細胞にどのような物質を導入したのかを容易に判別することが可能となる。また、記憶部３２Ａは、細胞への導入物質の導入動作に連動して、上記導入細胞情報を記憶する記憶手段として機能する。このように、物質の導入動作に連動して導入位置情報及び導入物質情報が自動的に登録されるので、導入を試みた細胞の情報が確実に記録され、操作者の登録忘れが発生することがない。

[0074] そして、モニタ表示部１０６に、導入ポイントＮｏ．１の位置情報を指定の色でマーカ１５０として表示する（ステップＳ２２Ｆ）。このマーカ１５０は、顕微鏡ＸＹステージ２２の移動に伴い、常に導入ポイントＮｏ．１の位置に表示される。即ち、予めチップ部６６の位置を登録しておくことで、

チップ部６６と導入細胞位置とを相対的に位置決めすることが可能となるので、導入した細胞が判別され、なおかつ細胞内のどの位置に物質を導入したのかを示すマーカ１５０を精度良く表示することができるようになる。

[0075] 以下、任意の細胞個々に対して物質の導入を繰り返し行う。

即ち、メニューバー１０４の「ファイル」項目のマウスクリック操作等で表示されるファイルメニューより終了が選択される等の所定の終了指示がなされたか否かを判別し（ステップＳ２３）、そのような終了指示がなければ、上記ステップＳ１９に戻って、上述した動作を繰り返す。

[0076] この場合、２回目からのチップ駆動では、記憶部３２ＡにＺ値をセットしているので（ステップＳ２１）、第２モード細胞導入動作を実施することになる（ステップＳ２４）。

[0077] この場合には、Ｚ値が記憶部３２Ａにセットされているので、ＸＹ水平方向を位置決めした後は、操作者は、操作モジュール５４による行き過ぎた操作を気にせずに、チップ部６６を十分下降させる操作をするだけで、最適位置まで下降させることができる。即ち、図１２に示すように、操作者による「導入」ボタン１１２の操作に応じて（ステップＳ２４Ａ）、制御コンピュータ３２は、コントロールボックス５６を介してＺ駆動部６０を駆動してチップ部６６を下降させていき、図示しない位置検出部で検出したアダプタ保持部５８の位置と記憶部３２ＡにセットされているＺ値とを比較して、アダプタ保持部５８（チップ部６６）が上記Ｚ値の位置に到達するまで、チップ部６６を下降させる（ステップＳ２４Ｂ）。

[0078] その後は、上記ステップＳ２２Ｄに進み、操作モジュール５４の操作に応じて、ニードル６４を上昇させることで、チップ部６６を退避させる。こうして物質が細胞に導入されたならば、自動的に、チップ部６６の位置に対応する顕微鏡ＸＹステージ２２の座標値及び導入物質情報を、記憶部３２Ａに設けた導入細胞リストの導入ポイントＮｏ．ｎの情報に登録し、その登録内容を操作部１０８に導入細胞リスト１２６として表示する（ステップＳ２２Ｅ）。勿論、１回目のチップ駆動と同様に、操作者の「導入ポイント登録」

１０４ボタンのマウスクリック操作に応じて、導入細胞リストに登録するようにしても構わない。そして、モニタ表示部１０６に、導入ポイントＮｏ．ｎの位置情報を指定の色でマーカ１５０として表示する（ステップＳ２２Ｆ）。このマーカ１５０は、顕微鏡ＸＹステージ２２の移動に伴い、常に導入ポイントＮｏ．ｎの位置に表示される。

[0079] また、この細胞への導入物質の導入動作に連動して、その時点で観察しているエリアを細胞操作エリアとして、記憶手段である記憶部３２Ａの操作エリアリストに記憶する。これにより、細胞操作を行ったエリアを確実に記録できる。そして、制御コンピュータ３２が、該記憶した上記細胞操作エリアに従って、その細胞操作エリアの位置を細胞操作エリア１３８として上記観察範囲１３２に重ね合わせて表示することで、細胞操作を行ったエリアを操作者が把握することが可能となる。

[0080] こうして、当該ディッシュ３６内の所望の細胞個々に対して物質の導入が終了したならば、操作者が上述した所定の終了指示を行う。よって、制御コンピュータ３２は、そのような終了指示がなされたならば（ステップＳ２３）、記憶部３２Ａに一時記憶されているサンプル情報、導入物質、観察範囲、細胞操作範囲、基準位置、操作エリアリスト、導入細胞リスト、等の情報をファイルとして、任意のファイル名で記憶部３２Ａに保存する（ステップＳ２５）。また、上記一時記憶されているサンプル情報、導入物質、観察範囲、細胞操作範囲、基準位置、操作エリアリスト、導入細胞リスト、等の情報を該記憶部３２Ａから削除する。

[0081] 一方、上記のようにして或る物質を導入したディッシュ３６に対して、別の物質を更に導入する場合がある。そのような場合には、上記ステップＳＴ７で一旦回収したディッシュ３６から、その中の導入物質が混濁された培養液を洗い流し、今回の導入物質を混濁した培養液に置換する。その後、そのディッシュ３６を上記ステップＳＴ５で再びディッシュホルダ１６上へ載置する。

[0082] そして、操作者は、上記操作ウィンドウ１０２におけるメニューバー１０

４の「ファイル」項目のマウスクリック操作等で表示されるファイルメニューより、上記ステップＳ２５で保存したファイルを読み出す操作を行う。

[0083] 即ち、制御コンピュータ３２は、ファイルメニューより新規ファイル作成が選択されない場合には（ステップＳ１１）、記憶部３２Ａに保存されているファイルの選択を受け付ける（ステップＳ２６）。そして、その受け付けた選択されたファイルよりサンプル情報、導入物質、観察範囲、細胞操作範囲、基準位置、操作エリアリスト、導入細胞リスト、等の情報を読み出して、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ２７）。

[0084] その後、操作部１０８の「観察」ボタン１２４がマウスクリック操作されたか否かを判別する（ステップＳ２８）。「観察」ボタン１２４が操作されない場合、上記ステップＳ１３と同様にして、導入物質リスト１２８のプルダウンリストから導入物質の選択がなされる（ステップＳ２９）。

[0085] その後、基準位置の登録を受け付け、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ３０）。これは、操作者がカーソルをモニタ表示部１０６の上記ステップＳ１６で指定したのと同一位置に合わせてマウスクリック操作により位置を指定して、「座標変換」ボタン１２０を操作することで、制御コンピュータ３２は、そのボタン操作に応じて上記指定位置を今回の基準位置として登録するものである。この基準位置は、上記ステップＳ１６と同様に、２点、登録する。そして、この登録された今回の基準位置の座標値と上記記憶部３２Ａに一時記憶された前回登録した基準位置の座標値との差分から、上記記憶部３２Ａに一時記憶された導入細胞リスト及び操作エリアリストにおける各座標値を現在のディッシュ３６の載置状態に応じた座標値に変換して、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ３１）。なお、このように座標値を変換することで位置合わせを行う代わりに、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介してθテーブル３４を回転させたり顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動させたりして、前回登録した基準位置の座標値に合致するようにディッシュ３６を移動させて、位置合わせを行うようにしても良い。このように、座標変換又はディッシュ３６の移動により位置合わせを行うことで、ディ

ッシュ３６を再配置後に物質を導入した細胞の位置を再現することが可能となる。

[0086] 次に、上記記憶部３２Ａに一時記憶された観察範囲及び操作範囲の情報に従って、培養器マップ表示部１１０に、観察範囲１３２及び細胞操作範囲１３４を表示すると共に、モニタ表示部１０６が表示している現在位置を現在位置１３６として表示する（ステップＳ３２）。また、上記記憶部３２Ａに一時記憶された操作エリアリストに従って、培養器マップ表示部１１０に、導入済の細胞操作エリア１３８を表示する（ステップＳ３３）。

[0087] 以上のように、制御コンピュータ３２及び／またはディッシュホルダ移動コントローラ２６は、ディッシュホルダ１６を顕微鏡ＸＹステージ２２上に再配置した際、導入細胞情報に基づいて、対応する細胞に対する操作時における細胞の観察状態を再現する再現手段として機能する。

[0088] その後、上記ステップＳ１７と同様にして、チップ部６６を細胞の上方から細胞に近接させていき（ステップＳ３４）、上記ステップＳ１８と同様にして、チップ部６６の位置を記憶部３２Ａに登録する（ステップＳ３５）。またこのとき、上記記憶部３２Ａに一時記憶された導入細胞リストに従って、モニタ表示部１０６に表示されるＣＣＤカメラ４６で取得した細胞の画像上に、前回導入した導入ポイントの位置情報を指定の色でマーカ１５０として表示する（ステップＳ３６）。このマーカ１５０は、顕微鏡ＸＹステージ２２でのディッシュホルダ１６の水平移動によるディッシュ３６の移動に伴い、常に導入ポイントの位置に表示される。

その後は、上記ステップＳ１９に進み、上述したような動作を実行する。

[0089] こうして、複数種類の導入物質を導入することができる。図１０は、２種類の導入物質を導入した場合のモニタ表示部１０６の表示例を示している。この場合、マーカ１５０は、導入物質毎に異なる色で表示される。なお、図１０では、色の違いをマーカ１５０の形状の違いで示しているが、実際には同一形状のマーカ１５０で色のみが異なるものとする。勿論、この図に示すように、色ではなくてマーカ１５０の形状で導入物質を区別可能に表示する

ことも可能である。その場合には、導入細胞リスト１２６における「色」の項目が「マーカ形状」項目となり、マーカ形状を示すものに変更され、また導入物質リスト１２８も色ではなくてマーカ形状のリストとなる。

[0090] 次に、観察を行う場合の細胞操作・観察動作を説明する。

この観察を行う場合には、操作部１０８の「観察」ボタン１２４がマウスクリック操作され、上記ステップＳ２８において、それが判別される。そして、その場合には、操作者による観察倍率の選定に応じて、顕微鏡コントローラ２８を介して観察倍率を設定する（ステップＳ３７）。即ち、物質導入に関しては固定の倍率で構わないが、観察に関しては種々の倍率で観察を行うことが想定されるので、操作者の要求に応じた観察倍率を設定する。

[0091] そしてその後、上記ステップＳ３０と同様にして、基準位置の登録を受け付け、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ３８）。そして、これにより登録された今回の基準位置の座標値と上記記憶部３２Ａに一時記憶された登録されている基準位置の座標値との差分から、上記記憶部３２Ａに一時記憶された導入細胞リスト及び操作エリアリストにおける各座標値を現在のディッシュ３６の載置状態に応じた座標値に変換して、記憶部３２Ａに一時記憶する（ステップＳ３９）。或は、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介してθテーブル３４を回転させたり顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動させたりして、登録されている基準位置の座標値に合致するようにディッシュ３６を移動させても良い。

[0092] 次に、上記ステップＳ３２と同様にして、培養器マップ表示部１１０に、観察範囲１３２、細胞操作範囲１３４及び現在位置１３６を表示する（ステップＳ４０）。また、上記ステップＳ３３と同様にして、培養器マップ表示部１１０に、導入済の細胞操作エリア１３８を表示する（ステップＳ４１）。そして、上記ステップＳ３６と同様にして、モニタ表示部１０６に、導入済の導入ポイントの位置情報を指定の色でマーカ１５０として表示する（ステップＳ４２）。このマーカ１５０は、顕微鏡ＸＹステージ２２の駆動によるディッシュ３６の移動に伴い、常に導入ポイントの位置に表示される。

[0093] その後、操作者によって、操作部１０８の導入細胞リスト１２６から所望の導入細胞が選択されてマウスがダブルクリック操作されることで、観察対象の細胞が選択される（ステップＳ４３）。この選択に応じて、制御コンピュータ３２は、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動して、その選択された細胞の位置にディッシュ３６を移動させることで、選択された導入済み細胞をモニタ表示部１０６に表示する（ステップＳ４４）。そして、上記選択されたフィルから読み出して記憶部３２Ａに一時記憶された観察条件の情報に基づいて、顕微鏡コントローラ２８を介して倒立型顕微鏡１２を設定し、観察を開始させる。このように、観察条件を登録しておくことで、自動観察が可能となる。なお、この観察時に、観察条件を適宜変更できるようになっていることは言うまでもない。また、導入細胞リスト１２６から選択するだけで導入細胞位置へディッシュ３６が移動されて、迅速に観察が進められる。勿論、導入細胞リスト１２６からの選択だけでなく、操作エリアリスト１３０からの選択でも、同様の動作が可能である。同一エリアで複数の観察条件がある場合、それぞれ順次実行する。

[0094] そして、操作者によって上述した所定の終了指示がなされたか否かを確認し（ステップＳ４５）、そのような終了指示がなされていない場合には、別の細胞を観察するものとして、上記ステップＳ４３に戻る。

[0095] 而して、所定の終了指示がなされたならば（ステップＳ４５）、記憶部３２Ａに一時記憶したサンプル情報、導入物質（変更された観察条件を含む）、観察範囲、細胞操作範囲、基準位置、操作エリアリスト、導入細胞リスト、等の情報をファイルとして、任意のファイル名で記憶部３２Ａに保存する（ステップＳ４６）。またこのとき、それら一時記憶していた情報を該記憶部３２Ａから削除する。

[0096] ［第２実施例］

本発明の第２実施例に係る細胞操作観察装置１０においては、ＸＹステージ操作用ジョイスティック２４の操作、モニタ表示部１０６のマウスクリッ

ク操作、導入ポイント選択のためのマウスクリック操作、細胞操作エリア選択のためのマウスクリック操作、等に応じて、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動する際には、図１３に示すようなＸＹステージ移動指令動作を実行する。

[0097] 即ち、まず、その移動先位置が細胞操作範囲内か否かを判別し（ステップＳ１００）、細胞操作範囲内であれば、ディッシュホルダ移動コントローラ２６を介して顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動してディッシュホルダ１６を水平移動することでディッシュ３６を移動させる（ステップＳ１０１）。そして、培養器マップ表示部１１０における現在位置１３６の表示を更新する（ステップＳ１０２）。

[0098] これに対して、上記ステップＳ１００において移動先位置が細胞操作エリア内でないと判別した場合には、顕微鏡ＸＹステージ２２を駆動することなく、モニタ３８上に警告表示灯を行う（ステップＳ１０３）。

[0099] 上記第１実施例では、操作者が培養器マップ表示部１１０に表示された細胞操作範囲１３４及び現在位置１３６を確認しながら、シャフト７６がディッシュ３６にぶつからないように顕微鏡ＸＹステージ２２の移動指示を行うようにしていた。これに対して、本第２実施例では、駆動制御手段として機能する制御コンピュータ３２が、顕微鏡ＸＹステージ２２の移動前に細胞操作範囲と移動先位置との比較を行うことで、移動先位置が細胞操作範囲をオーバーする場合には移動しないようにしている。こうすることで、操作者の負担を軽減することができ、細胞操作ツールであるシャフト６４を不用意に細胞にぶつけてしまう危険性を確実に防止できる。

[0100] 以上、実施例に基づいて本発明を説明したが、本発明は上述した実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内で種々の変形や応用が可能なことは勿論である。

[0101] 例えば、図１０に示した操作ウィンドウ１０２は一例であり、モニタ表示部１０６、操作部１０８及び培養器マップ表示部１１０の配列はこれに限定されるものではない。また、操作部１０８のボタンやリストの表示も、これ

に限定されるものではない。

請求の範囲

[請求項1] 細胞へ物質を導入して観察する細胞操作観察装置（１０）において、

細胞を培養する培養器（３６）を水平方向に移動可能に載置するステージ（１６）と、

上記ステージに載置された上記培養器内の細胞を撮像して表示する観察手段（２０，３０，３２，３８）と、

上記観察手段によって観察可能な培養器の範囲である観察範囲に対応する図（１３２）と、該図に重ね合わせて、細胞操作可能な範囲である細胞操作範囲（１３４）及び上記観察手段によって現在観察している位置（１３６）とを表示する図表示手段（１１０）と、

上記ステージに載置された上記培養器内の細胞の内、物質の導入を行う細胞の位置を指定する指定手段（３２）と、

上記ステージを駆動して、上記指定手段によって指定された位置を上記観察手段の視野内の所定の細胞操作位置に配置する導入位置配置手段（２６，３２）と、

上記導入位置配置手段によって上記所定の細胞操作位置に移動された細胞の細胞膜を細胞操作ツール（６４）によって穿孔することで、上記培養器内の培養液中に混濁させた導入物質を上記細胞に導入する細胞操作手段（１４，５４，５６）と、

を具備することを特徴とする細胞操作観察装置。

[請求項2] 上記培養器の種類と上記細胞操作手段の種類とに応じた細胞操作範囲のリストを記憶する記憶手段（３２Ａ）と、

上記培養器の種類と上記細胞操作手段の種類とを指定する種類指定手段（３２）と、

を更に具備し、

上記図表示手段は、上記種類指定手段によって指定された上記培養器及び上記細胞操作手段の種類に従って上記記憶手段に記憶された上

記リストより上記細胞操作範囲を読み出して表示することを特徴とする請求項１に記載の細胞操作観察装置。

[請求項3] 上記ステージに載置された上記培養器の形状を測定する測定手段を更に具備し、

上記図表示手段は、上記測定手段によって測定された上記培養器の形状に基づいて上記ステージ上での観察位置を特定して上記図を表示することを特徴とする請求項２に記載の細胞操作観察装置。

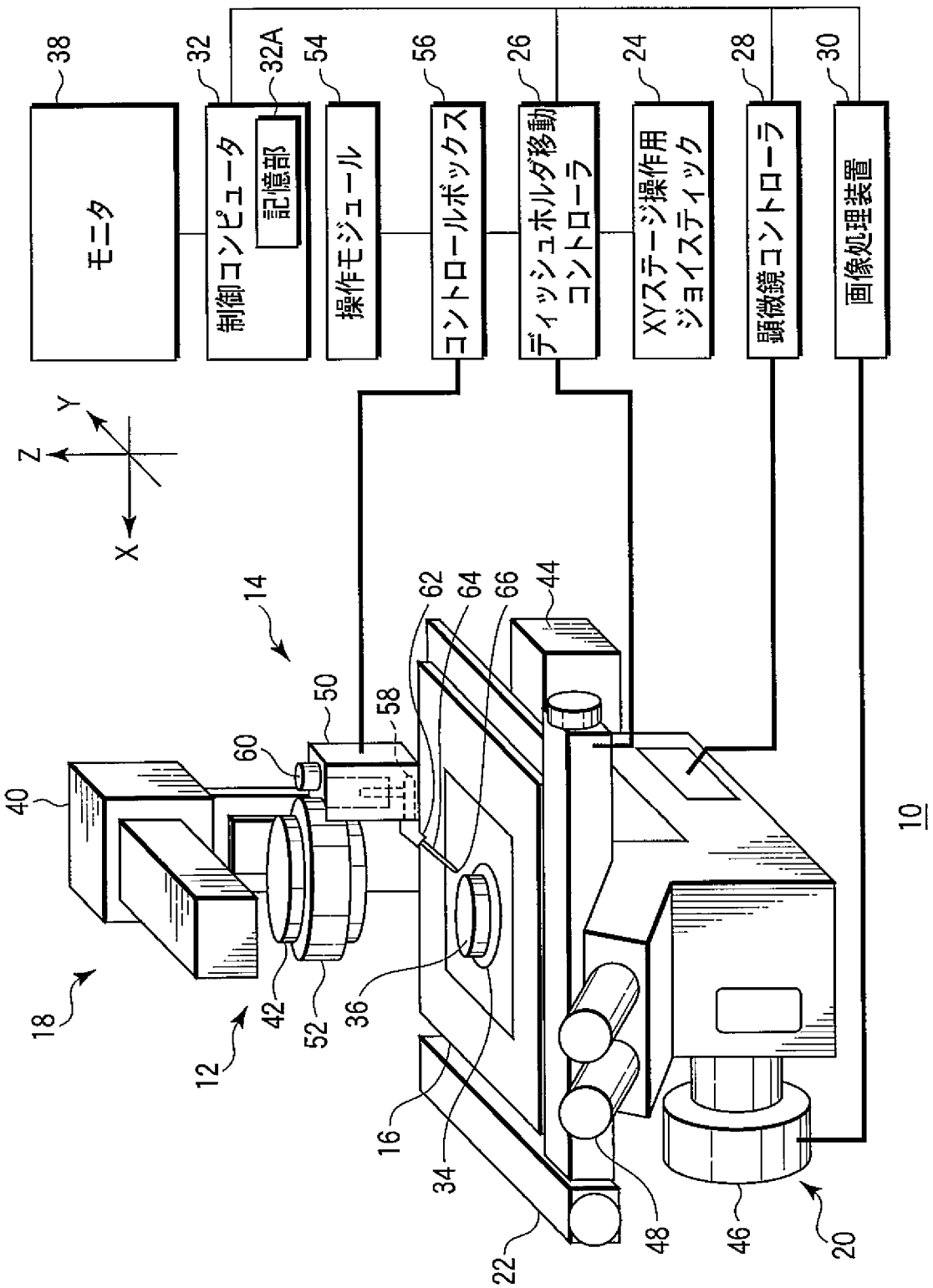
[請求項4] 上記観察手段による細胞の表示（１０６）と上記図表示手段による図の表示とは、同一の画面（１０２）上に行われることを特徴とする請求項１に記載の細胞操作観察装置。

[請求項5] 上記導入位置配置手段は、上記指定手段によって指定された位置と上記細胞操作範囲とを比較し、上記指定された位置が上記細胞操作範囲をオーバーするときには、上記ステージの駆動を行わないように制御する駆動制御手段（３２）を更に具備することを特徴とする請求項１に記載の細胞操作観察装置。

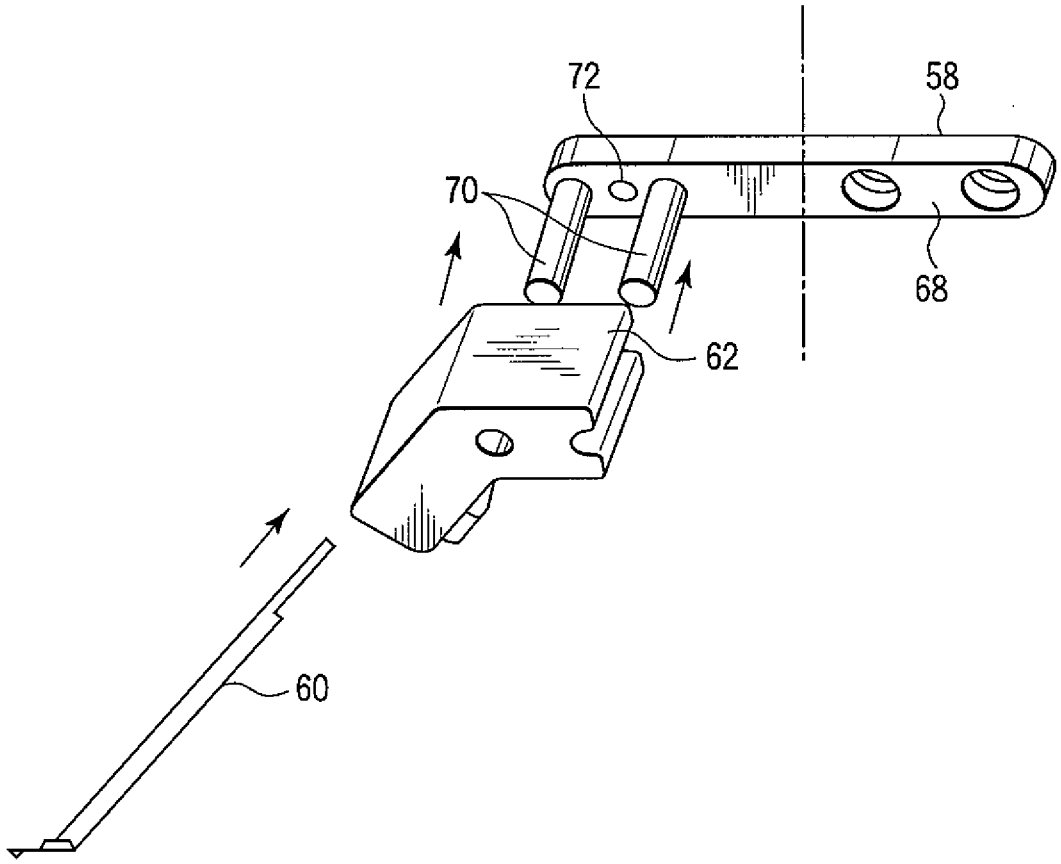
[請求項6] 上記細胞操作手段による細胞への導入物質の導入動作に連動して、その時点で上記観察手段によって観察しているエリアを細胞操作エリアとして記憶する記憶手段（３２Ａ）を更に具備し、

上記図表示手段は、更に、上記記憶手段に記憶した上記細胞操作エリアに従って、その細胞操作エリアを示す図（１３８）を上記観察範囲に対応する図に重ね合わせて表示することを特徴とする請求項１に記載の細胞操作観察装置。

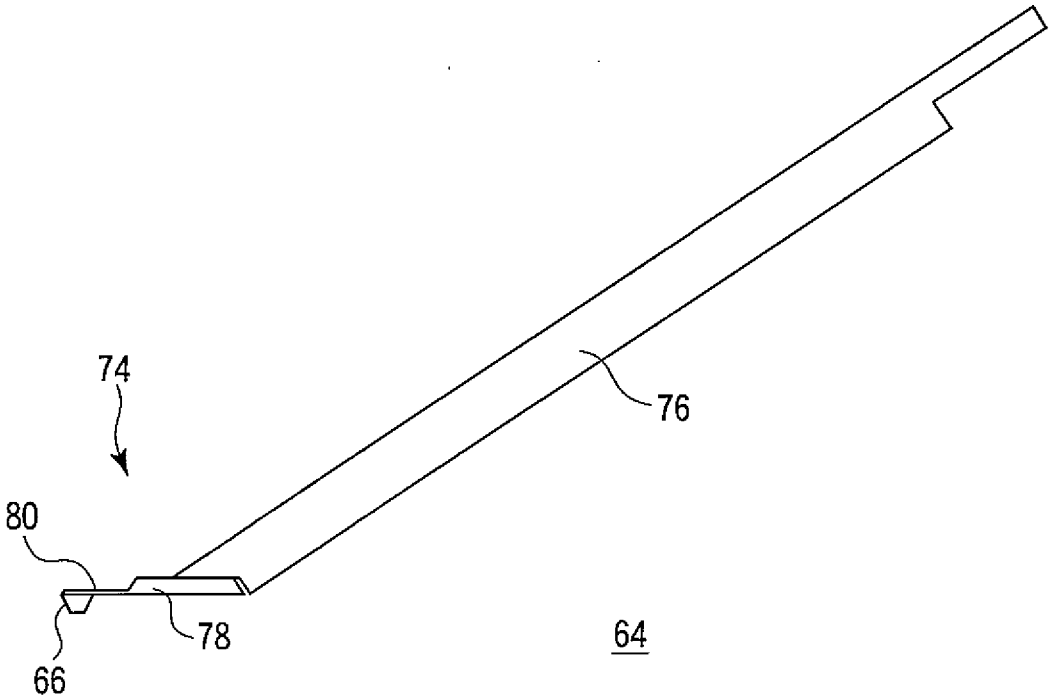
[図1]


モニタ
制御コンピュータ
記憶部
操作モジュール
コントロールボックス
ディッシュホルダ移動コントローラ
XYステージ操作用ジョイスティック
顕微鏡コントローラ
画像処理装置
38
32
32A
54
56
26
24
28
30
Y
Z
X
14
62
64
66
44
50
58
60
40
18
12
42
52
36
16
34
22
48
46
20
10

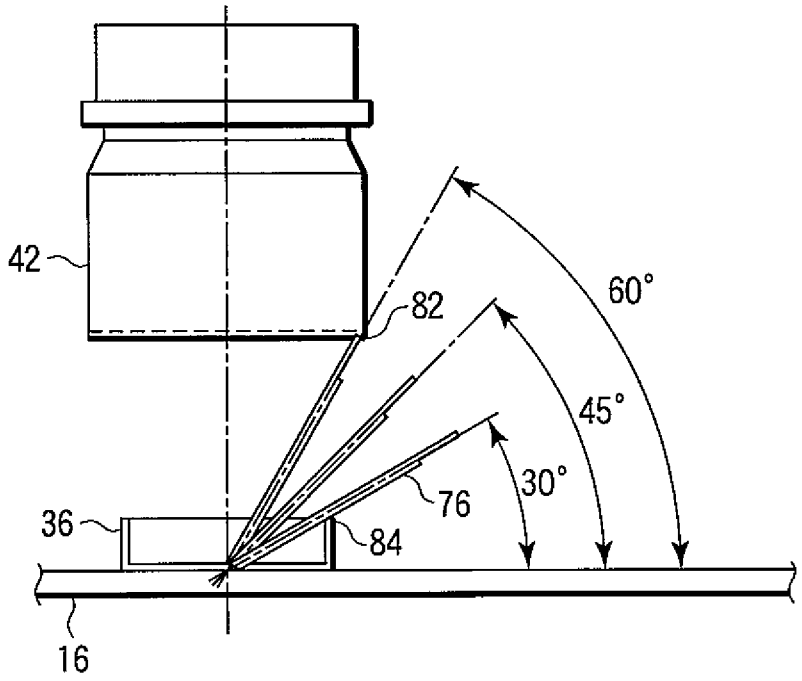
[図2]



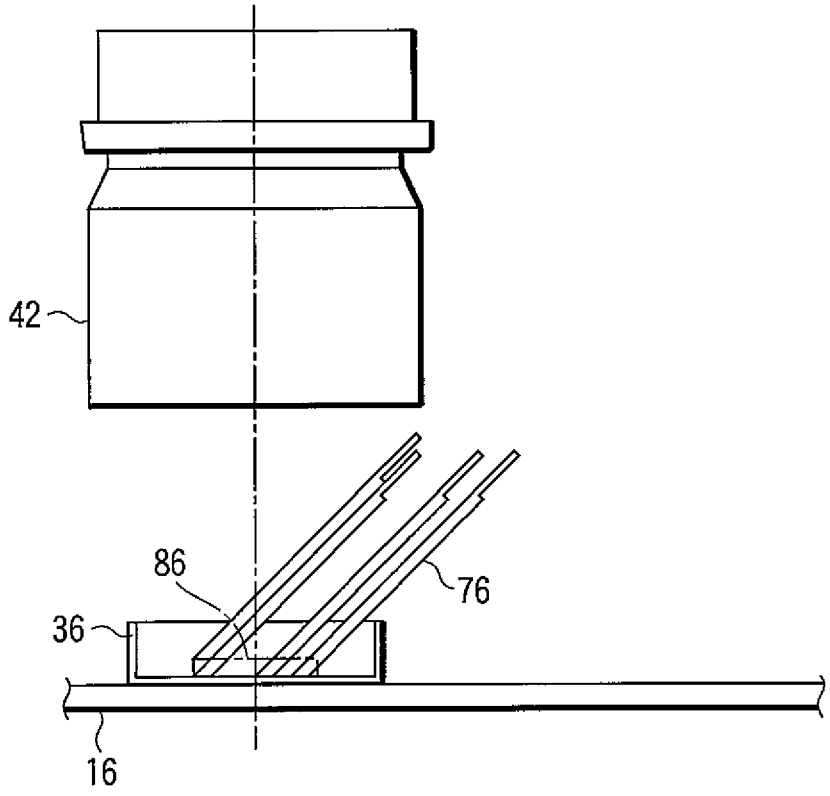
[図3]



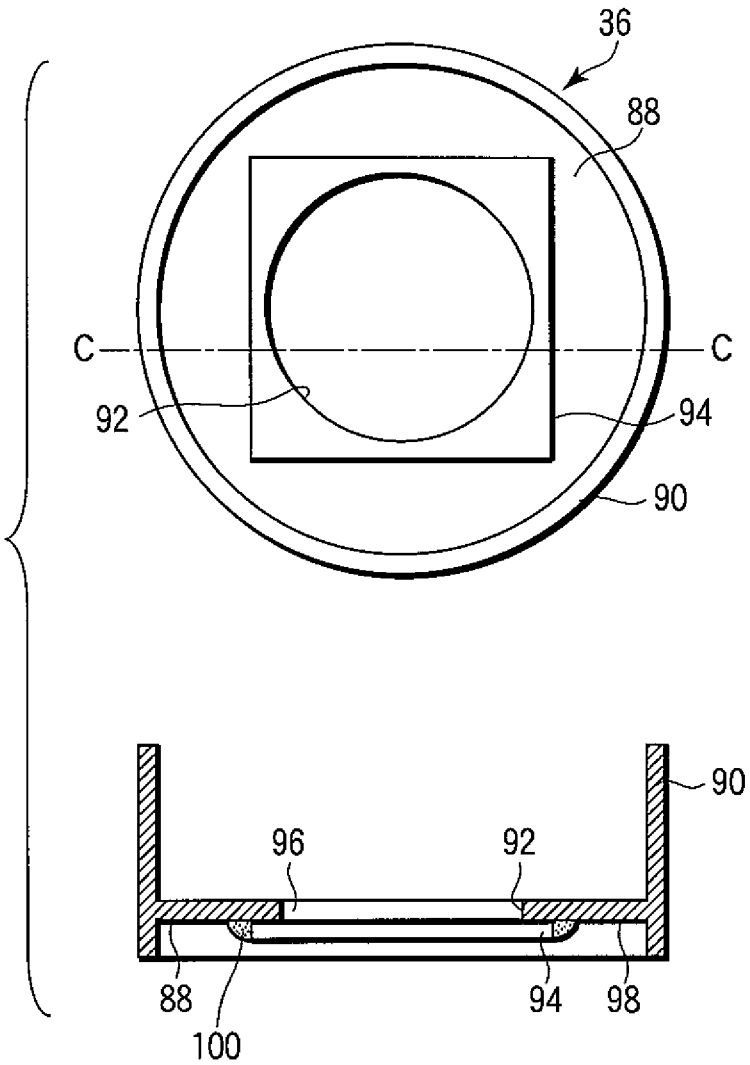
[図4]



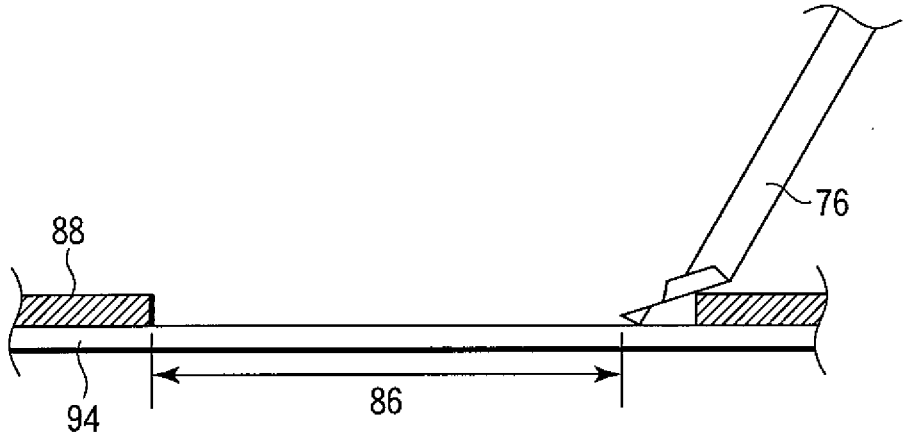
[図5]



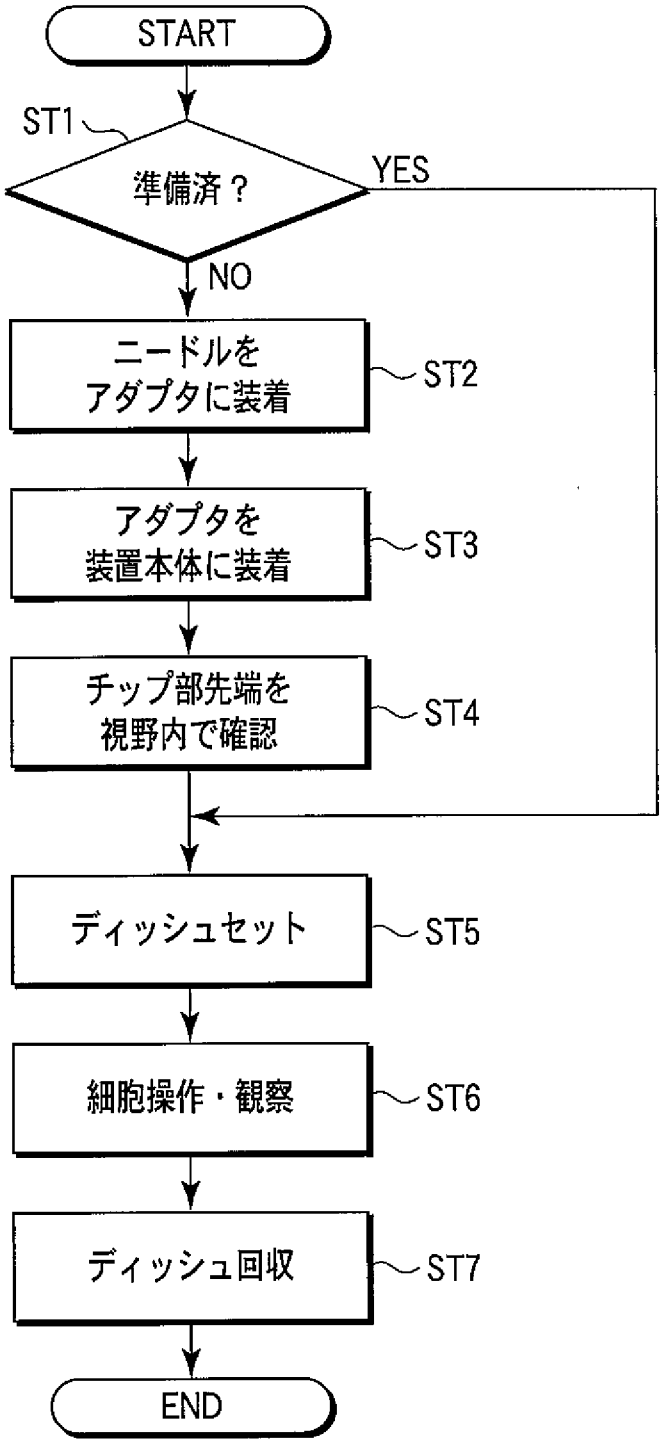
[図6]



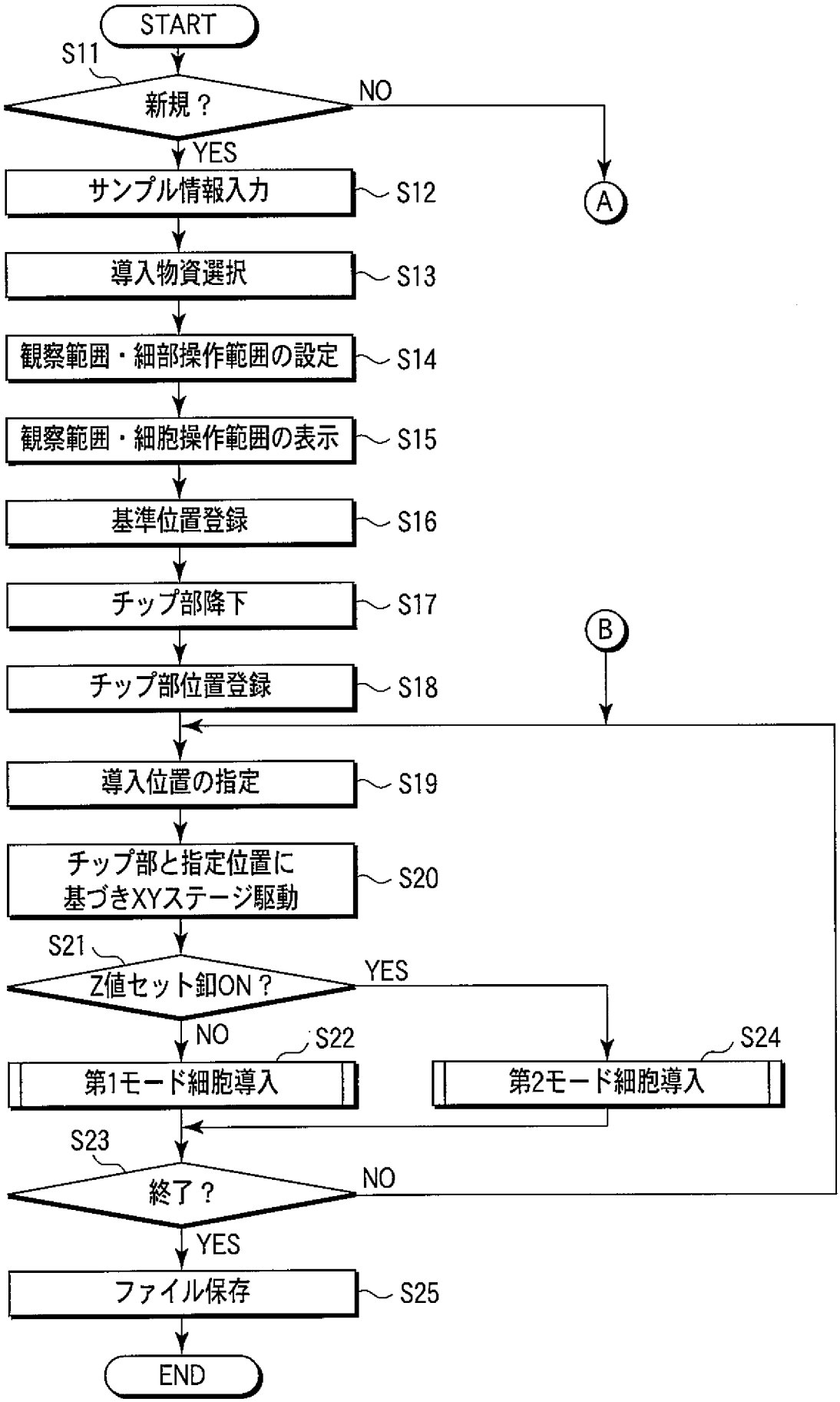
[図7]



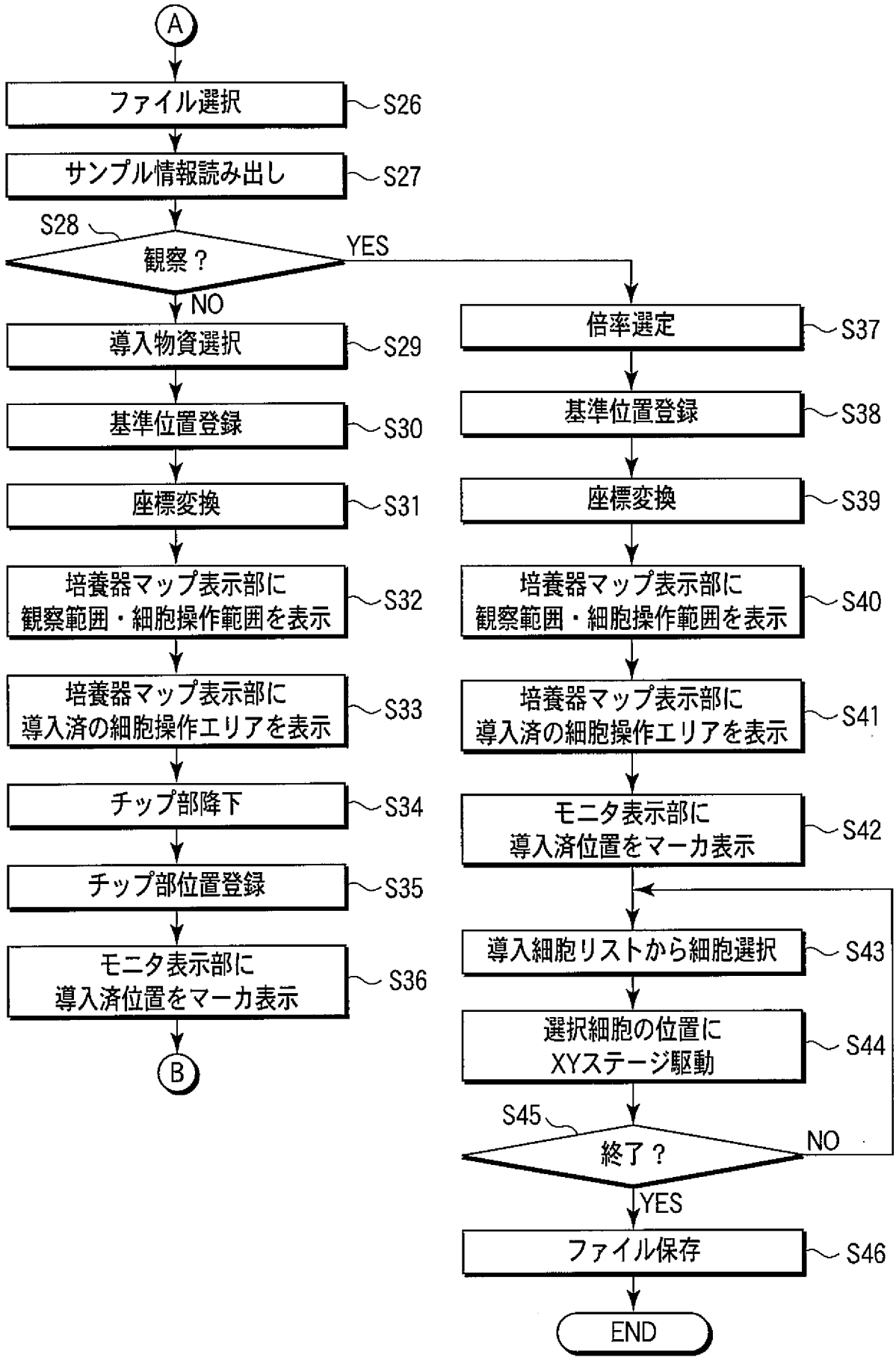
[図8]


START
ST1
準備済？
YES
NO
ニードルを
アダプタに装着
ST2
アダプタを
装置本体に装着
ST3
チップ部先端を
視野内で確認
ST4
ディッシュセット
ST5
細胞操作・観察
ST6
ディッシュ回収
ST7
END

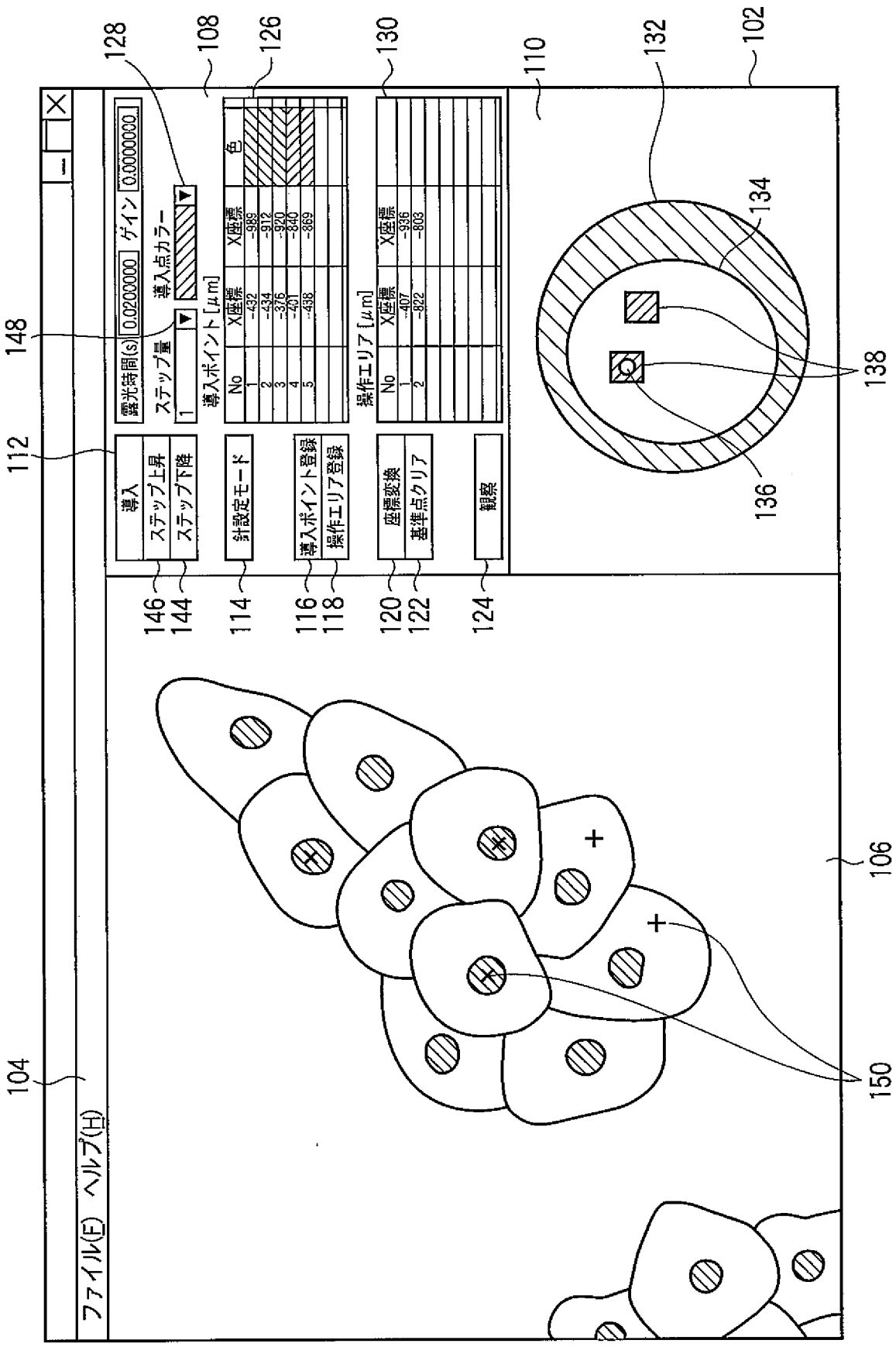
[図9A]


START
S11
新規？
NO
YES
サンプル情報入力
S12
A
導入物資選択
S13
観察範囲・細部操作範囲の設定
S14
観察範囲・細胞操作範囲の表示
S15
基準位置登録
S16
チップ部降下
S17
B
チップ部位置登録
S18
導入位置の指定
S19
チップ部と指定位置に
基づきXYステージ駆動
S20
S21
Z値セット釦ON？
YES
NO
S22
S24
第1モード細胞導入
第2モード細胞導入
S23
終了？
NO
YES
ファイル保存
S25
END

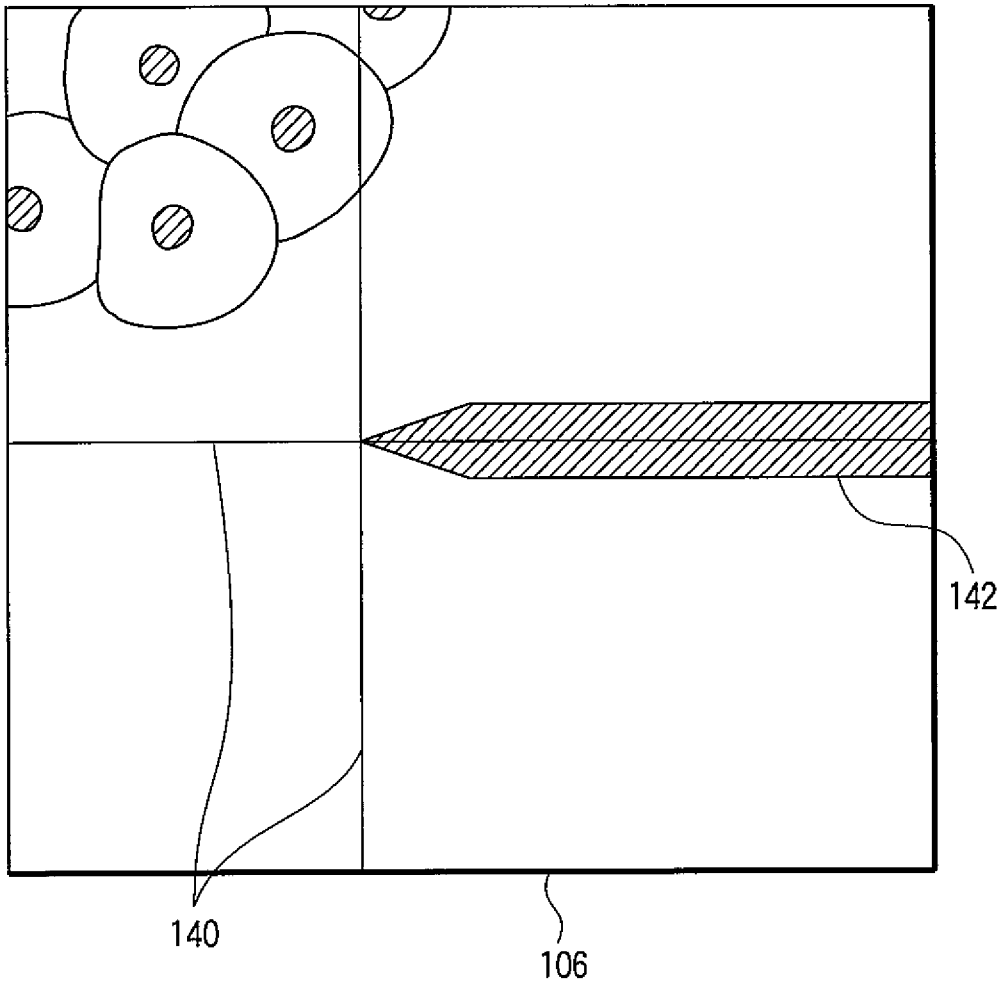
[図9B]


A
ファイル選択
S26
サンプル情報読み出し
S27
S28
観察？
YES
NO
導入物資選択
S29
基準位置登録
S30
座標変換
S31
培養器マップ表示部に
観察範囲・細胞操作範囲を表示
S32
培養器マップ表示部に
導入済の細胞操作エリアを表示
S33
チップ部降下
S34
チップ部位置登録
S35
モニタ表示部に
導入済位置をマーカ表示
S36
B
倍率選定
S37
基準位置登録
S38
座標変換
S39
培養器マップ表示部に
観察範囲・細胞操作範囲を表示
S40
培養器マップ表示部に
導入済の細胞操作エリアを表示
S41
モニタ表示部に
導入済位置をマーカ表示
S42
導入細胞リストから細胞選択
S43
選択細胞の位置に
XYステージ駆動
S44
S45
終了？
NO
YES
ファイル保存
S46
END

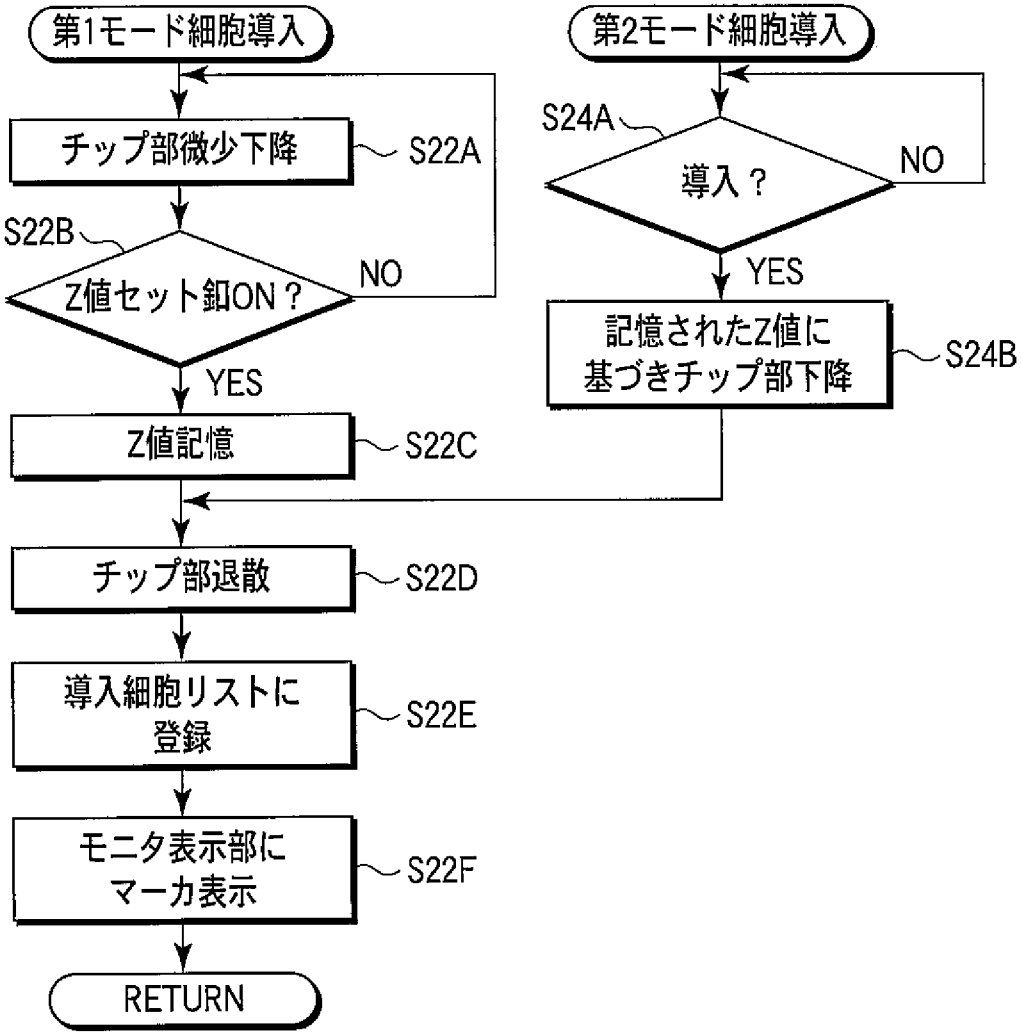
[図10]


ファイル(F) ヘルプ(H)
導入
ステップ上昇
ステップ下降
露光時間(s) 0.0200000
ステップ量
1
導入点カラー
ゲイン 0.0000000
導入ポイント[μm]
No X座標 色
1 -432 -988
2 -434 -912
3 -376 -920
4 -401 -840
5 -438 -869
針設定モード
導入ポイント登録
操作エリア登録
操作エリア[μm]
No X座標
1 -407 -936
2 -822 -803
座標変換
基準点クリア
観察
104
106
108
110
112
114
116
118
120
122
124
126
128
130
132
134
136
138
144
146
148
150

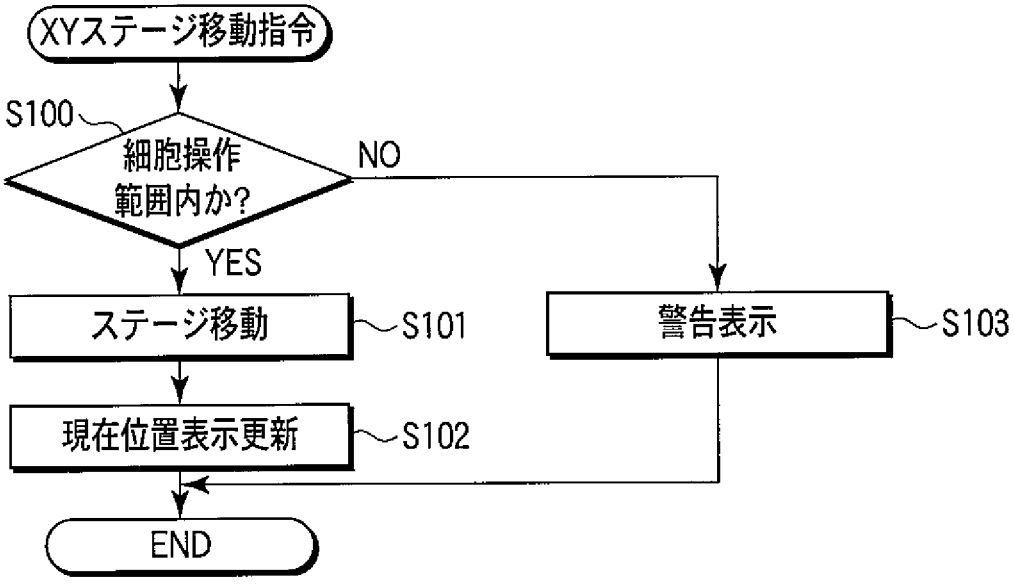
[図11]



[図12]


第1モード細胞導入
チップ部微少下降
S22A
S22B
Z値セット釦ON？
NO
YES
Z値記憶
S22C
第2モード細胞導入
S24A
導入？
NO
YES
記憶されたZ値に
基づきチップ部下降
S24B
チップ部退散
S22D
導入細胞リストに
登録
S22E
モニタ表示部に
マーカ表示
S22F
RETURN

[図13]


XYステージ移動指令
S100
細胞操作
範囲内か?
NO
YES
ステージ移動
S101
現在位置表示更新
S102
警告表示
S103
END

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/060958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12M1/34(2006.01)i, G06T1/00(2006.01)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)
C12M1/34, G06T1/00

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/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-136400 A (Olympus Corp.), 19 June, 2008 (19.06.08), Full text (Family: none)	1-6
Y	JP 2006-238802 A (Olympus Corp.), 14 September, 2006 (14.09.06), Full text & WO 2006/092925 A1	1-6
A	JP 2008-136402 A (Olympus Corp.), 19 June, 2008 (19.06.08), (Family: none)	1-6

☐ 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
07 September, 2009 (07.09.09)	15 September, 2009 (15.09.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０６０９５８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12M1/34(2006.01)i, G06T1/00(2006.01)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.　C12M1/34, G06T1/00

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/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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	JP 2008-136400 A (オリンパス株式会社) 2008.06.19, 全文 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2006-238802 A (オリンパス株式会社) 2006.09.14, 全文 & WO 2006/092925 A1	1-6
A	JP 2008-136402 A (オリンパス株式会社) 2008.06.19, (ファミリーなし)	1-6

☐　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
０７．０９．２００９	１５．０９．２００９

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
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	石丸　聡	４Ｂ	３７７７
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		