

(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
2020年7月2日(02.07.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/136896 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 21/63 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/048568

(22) 国際出願日: 2018年12月28日(28.12.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人: 株式会社ニコン (NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 櫻井 敦朗 (SAKURAI, Atsuro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 中田 千枝子 (NAKADA, Chieko); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内

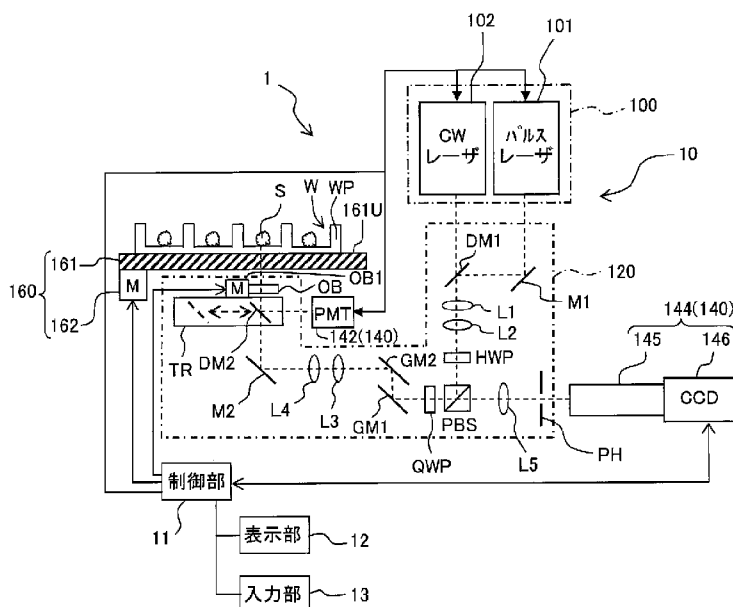
Tokyo (JP). 坂本 ちか (SAKAMOTO, Chika); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 武居 俊輔 (TAKEL, Shunsuke); 〒1086290 東京都港区港南二丁目15番3号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 川北 喜十郎, 外 (KAWAKITA, Kijuro et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿一丁目5番4号 YKBマイクガーデン 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: EVALUATION DEVICE AND EVALUATION METHOD

(54) 発明の名称: 評価装置、及び、評価方法



(57) Abstract: Provided is an evaluation device that evaluates a three-dimensional cultured cell mass. A microscope device 10 has the two functions of a multiphoton excitation microscope and a Brillouin scattering microscope. The microscope device 10 functions as a multiphoton excitation microscope to acquire position information pertaining to the cells contained in a cell mass. The microscope device 10 functions as a Brillouin scattering microscope to receive scattered light from light directed at the cells on the basis of the cell position information.

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 3次元培養した細胞の塊を評価する評価装置を提供する。顕微鏡装置10は、多光子励起顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡の2つの機能を有している。顕微鏡装置10は、多光子励起顕微鏡として機能して、細胞の塊に含まれる細胞の位置情報を取得する。顕微鏡装置10は、ブリルアン散乱顕微鏡として機能して、前記細胞の位置情報に基づいて照射される光の散乱光を受光する。

明 細 書

発明の名称：評価装置、及び、評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、評価装置、及び、評価方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞の塊を観察することが知られている。例えば特許文献1もしくは特許文献2が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：US201113315794A

特許文献2：US201213364928A

発明の概要

[0004] 本実施形態の第1の態様に従えば、細胞の塊に含まれる細胞の位置情報を取得する取得部と、細胞の位置情報に基づいて照射される光の散乱光を受光する受光部を備える、評価装置が提供される。

本実施形態の第2の態様に従えば、細胞の塊に照射された光の、細胞の塊に含まれる細胞による散乱光を受光する受光部と、受光部からの散乱光に関する信号に基づいて、細胞の状態を評価する評価部を備える、評価装置が提供される。

本実施形態の第3の態様に従えば、細胞の塊に含まれる細胞の位置情報を取得することと、細胞の位置情報に基づいて照射される光の散乱光を受光することと、を備える、評価方法が提供される。

本実施形態の第4の態様に従えば、細胞の塊に照射された光の、細胞の塊に含まれる細胞による散乱光を受光することと、受光した散乱光に関する信号に基づいて、細胞の状態を評価することと、を備える、評価方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0005] [図1]図1は、本実施形態にかかる評価装置1の概略図である。

[図2]図2は、試料に光を照射した際に発生する散乱光を説明するための説明図である。

[図3]図3は、細胞の塊に含まれる細胞の状態を評価する方法の手順を示すフローチャートである。

[図4]図4は、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いることと、顕微鏡装置10をブリルアン散乱顕微鏡として用いることを説明するための説明図である。

[図5]図5は、ブリルアンシフトの大きさを横軸にしたヒストグラムを作成することにより、細胞をその硬さに関する情報に基づいて分類すること示す説明図である。

[図6]図6(a)は、複数の細胞によって散乱されたブリルアン散乱光を受光して、複数の細胞全体としての硬さの情報を取得することを示す説明図であり、図6(b)は、分光されたブリルアン散乱光の振動数分布を示す説明図である。

[図7]図7は、ブリルアン散乱光を用いて流路中を流れる細胞の硬さに関する情報を取得することを説明するための説明図である。

[図8]図8は、変更形態にかかる評価装置1の概略図である。

[図9]図9(a)は、細胞の塊の所定の断面における断面図であり、図9(b)は、各領域の位置と、各領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをプロットしたグラフであり、図9(c)は、1つの領域の中に含まれる小領域の位置と、小領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをさらにプロットしたグラフであり、図9(d)は、細胞の1つについて測定したときのブリルアン散乱光の振動数分布を示したスペクトルであり、図9(e)は、細胞の1つについて、多光子励起顕微鏡で自家蛍光を測定することによって得られた、細胞の外形を示す画像であり、図9(f)は、図9(e)の画像にブリルアンシフトのシフト量の分布を重ね合わせた合成画像である。

[図10]図10は、表示部12に表示される画面の一例である。

[図11]図11は、表示部12に表示される画面の別の一例である。

発明を実施するための形態

[0006] 以下の記載においては、XYZ直交座標系を設定し、このXYZ直交座標系に基づいて位置関係を説明している。Z軸方向は、例えば鉛直方向に設定され、X軸方向及びY軸方向は、例えば、水平方向に平行で互いに直交する方向に設定される。

[0007] 本明細書において、複数の細胞が3次元的に凝集したものを細胞の塊と呼んでいる。細胞の塊の例としては、組織切片、細胞スフェロイド、オルガノイド等が挙げられる。なお、細胞スフェロイドとは、3次元培養された細胞の3次元的な塊であり、オルガノイドとは、臓器の特色の一部を備えている、小さくて単純化された細胞の集まりである。オルガノイドは、例えば、iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞を原料として、細胞培養の条件を制御しつつ細胞を分化させることにより、3次元的に試験管内（*in vitro*）で作製することができる。また、細胞の塊には、2次元的に広がった細胞（例えば、細胞シート）も含まれる。細胞シートは単層でもよいし、積層されたものでも複数の層のあるものでも構わない。

[0008] 上述のように、3次元培養は2次元培養と比較して、立体構造を持ったより複雑な系を構築することが可能であり、より生体内に類似した環境を構築することが可能である。そのため、細胞スフェロイドやオルガノイドのような3次元培養された細胞の塊を、基礎研究、創薬研究、再生医療などの分野において応用したいという要求がある。それに伴って、細胞の塊に含まれる細胞の状態を評価することが望まれている。

[0009] 細胞の塊に含まれる細胞の状態を評価するための手法の1つとして、細胞の硬さを検出することが挙げられる。細胞の硬さは、細胞増殖や細胞死の誘導、さらには癌細胞の転移などの細胞過程に重要な因子である。また、細胞骨格をはじめとする細胞の構成物の密度やその構造により細胞の硬さが変わる。

- [0010] 本実施形態においては、細胞の塊の内部に含まれる細胞にも適用可能な評価装置 1 について説明する。
- [0011] まず、図 1 を参照しつつ、本実施形態に係る評価装置 1 について説明する。評価装置 1 は、顕微鏡装置 10 と、制御部 11 と、表示部 12 と、入力部 13 とを主に備えている。
- [0012] 顕微鏡装置 10 は、照明部 100 と、光学系 120 と、受光部 140 と、試料 S が置かれる可動ステージ 160 とを主に備えている。顕微鏡装置 10 は、多光子励起顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡の 2 つの機能を有しており、これらの機能を切り替えることができる。顕微鏡装置 10 は、本実施形態の取得部の一例であり、且つ、本実施形態の受光部の一例である。
- [0013] 照明部 100 は、パルスレーザ 101 と CW レーザ 102 とを有している。パルスレーザ 101 は、いわゆるフェムト秒レーザであり、数十フェムト秒～数百フェムト秒のパルス幅のレーザ光を発生させることができる。本実施形態ではチタンサファイアレーザが用いられている。パルスレーザ 101 は、赤外から近赤外領域（波長約 700 nm～約 1300 nm）のレーザ光を発生させることができる。CW レーザ 102 は、波長 532 nm の連続波レーザであり、本実施形態では半導体レーザが用いられている。なお、CW レーザ 102 からは、直線偏光したレーザ光が発せられる。
- [0014] 図 1 に示されるように、光学系 120 は、2 つのダイクロイックミラー DM1、DM2 と、2 つのミラー M1、M2 と、2 つのガルバノミラー GM1、GM2 と、5 つのレンズ L1～L5 と、 $\lambda/2$ 位相差板 HWP と、 $\lambda/4$ 位相差板 QWP と、偏光ビームスプリッタ PBS と、対物レンズ OB と、ピンホール PH とを備える。また、対物レンズ OB は、対物レンズ OB を Z 軸方向に移動させる移動機構 OB1 を備えている。移動機構 OB1 が対物レンズ OB を Z 軸方向に移動させることで、対物レンズ OB の焦点位置を Z 方向に移動させることができる。
- [0015] まず、顕微鏡装置 10 をブリルアン散乱顕微鏡として用いる場合について、レーザ光の光路を説明する。なお、この場合には、ターレット TR により

ダイクロイックミラーDM2は光路上から取り除かれる。CWレーザ102から照射された直線偏光したレーザ光は、ダイクロイックミラーDM1を透過してレンズL1、L2に向かって直進する。レンズL1、L2はビームエクspanderの役割を持っており、レンズL1に入射する光のビームの直径よりも大きい直径のビームをL2から出射することができる。ここで、ダイクロイックミラーDM1は、CWレーザ102からのレーザ光（波長532nm）を透過させ、パルスレーザ101からのレーザ光（波長約700nm～約1300nm）を反射する特性を有する。レンズL1、L2を通ったレーザ光は、 $\lambda/2$ 位相差板HWPを通ることにより、偏光ビームスプリッタPBSに対してS偏光となるように偏光の向きが調整される。偏光ビームスプリッタPBSは、S偏光を反射し、P偏光を透過させる特性を有している。そのため、レーザ光は偏光ビームスプリッタPBSで反射されて、 $\lambda/4$ 位相差板QWPを通して、1対のガルバノミラーGM1、GM2に入射する。ガルバノミラーGM1、GM2は、往復揺動可能な走査ミラーであり、2つのガルバノミラーGM1、GM2を組み合わせることにより、レーザ光をX-Y方向に走査できる。

[0016] 2つのガルバノミラーGM1、GM2を出たレーザ光は、レンズL3、L4を通った後、ミラーM2により上方にむけて反射され、対物レンズOBに入射する。なお、レンズL3、L4は、リレーレンズ光学系である。試料Sで散乱した散乱光は、光路を逆に進んで $\lambda/4$ 位相差板QWPに入る。 $\lambda/4$ 位相差板QWPを2回通ることになるので、散乱光の偏光状態は、偏光ビームスプリッタPBSに対してP偏光となる。そのため、散乱光は偏光ビームスプリッタPBSを透過して直進する。偏光ビームスプリッタPBSを透過した散乱光はレンズL5によりピンホールPHの位置に集光された後、ピンホールPHを通過した散乱光は、後述の受光部140の第2受光部144に入る。

[0017] 次に、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いる場合について、レーザ光の光路を説明する。なお、この場合には、ターレットTRによりダイ

クロイックミラーDM2は光路上に挿入される。

[0018] パルスレーザ101から照射されたレーザ光は、ミラーM1により反射された後、ダイクロイックミラーDM1により反射されて、レンズL1、L2に向かって進む。上述のように、ダイクロイックミラーDM1は、CWレーザ102からのレーザ光（波長532nm）を透過させ、パルスレーザ101からのレーザ光（波長約700nm～約1300nm）を反射する特性を有する。パルスレーザ101からのレーザ光は、上記と同じ光路を進んで、もう一つのダイクロイックミラーDM2を透過して、試料Sに照射される。ダイクロイックミラーDM2は、パルスレーザ101からのレーザ光（波長約700nm～約1300nm）を透過させ、パルスレーザ101からのレーザ光よりも波長の短い光（例えば、後述の多光子励起過程により発生する蛍光）を反射する特性を有する。試料Sにおいて、2つ以上の光子が1つの蛍光分子にほぼ同時に衝突して蛍光分子を励起させる多光子励起過程により、パルスレーザ101からのレーザ光の波長よりも短い波長の蛍光が放出される。多光子励起過程により発生した蛍光の一部は、光路を逆に進んで、ダイクロイックミラーDM2により反射されて、後述の受光部140の第1受光部142に入る。

[0019] 受光部140は、第1受光部142と第2受光部144とを有する。第1受光部142は、ターレットTRによりダイクロイックミラーDM2が光路上に挿入されて、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いるときに、試料Sに含まれる細胞から発せられる蛍光を受光する。第1受光部142は、光電子増倍管PMTを有し、試料Sに含まれる細胞から発せられる蛍光の強度を計測する。第2受光部144は、ターレットTRによりダイクロイックミラーDM2が光路上から取り除かれて、顕微鏡装置10をブリルアン散乱顕微鏡として用いるときに、ブリルアン散乱光を検出する。第2受光部144は、分光器145とCCD146とを有する。ブリルアン散乱光は、分光器145によって分光され、CCD146で観測される。CCD146は、光が入射した位置に応じて異なる信号を出力する。言い換えると、CCD

146は、光が入射した位置の位置情報を含む信号を出力する。CCD146から出力される、光が入射した位置の位置情報を含む出力信号を用いて、制御部11は、後述のブリルアンシフトを求めることができる。

[0020] 可動ステージ160は、図1のXY平面に平行な上面161Uを有するステージ161と、ステージ161をX方向、Y方向及びZ方向に移動させる移動機構162とを備えている。ステージ161の上面161Uには、試料Sが入ったウェルプレートWPが配置される。ウェルプレートWPは、透明な板状の部材であり、その表面には複数のくぼみ（ウェルW）が2次元的に配置されている。それぞれのウェルWは、試験管またはシャーレとして利用することができる。移動機構162は、制御部11の制御のもとで、ステージ161のX方向の位置、Y方向の位置、Z方向の位置をそれぞれ調整することができる。これにより、ステージ161の上面161Uに置かれたウェルプレートWPの位置を調整することができ、ウェルプレートWP内の所望のウェルWに入れられた試料Sに対してレーザ光を照射することができる。

[0021] 制御部11は、顕微鏡装置10の照明部100、光学系120、受光部140、可動ステージ160の各部の少なくとも一つの動作を制御する。また、制御部11は、入力部13を通じて顕微鏡装置10の各部に対する設定及び指示を受け付ける。制御部11は顕微鏡装置10の各部に対する設定及び指示を受け付けるための設定画面を表示部12に表示させる。入力部13は、各種指示情報を入力する不図示のマウス、キーボード、ジョイスティック、タッチパネルなどを有する。表示部12は設定画面、指示画面、計測画面、計測結果などを表示する表示画面を有する。

[0022] 制御部11は、ガルバノミラーGMの駆動を制御することによってレーザ光の照射位置（焦点位置）をX-Y方向に走査することができる。さらに、制御部11は、光学系120の焦点深さを変えることによって、レーザ光の焦点位置のZ方向の位置を調整することができる。このようにして、制御部11は、レーザ光の焦点位置をX-Y-Z方向に走査させることができる。これにより、制御部11は、レーザ光を各位置に照射したときに、受光部1

40で観測される蛍光の強度及びブリルアンシフトを用いて、蛍光の強度分布及びブリルアンシフトの3次元マッピングを取得することができる。例えば、後述のように、制御部11は、取得した3次元マッピングの画像を表示部12に表示させることができる。

[0023] なお、制御部11は、専用のハードウェアにより形成されていてもよく、パーソナルコンピュータに所定のプログラムを実装することにより形成されていてもよい。制御部11と顕微鏡装置10とは、必ずしも一体の装置として形成されていなくてもよい。例えば、制御部11は、有線又は無線により顕微鏡装置10に通信可能に接続されたコンピュータであってもよい。

[0024] 次に、顕微鏡装置10が有する機能である多光子励起顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡について、詳細に説明する。

[0025] 多光子励起顕微鏡とは、2つ以上の光子を1つの蛍光分子にほぼ同時に衝突させて蛍光分子を励起させる多光子励起過程を利用した顕微鏡である。多光子励起過程を利用する場合には、1つの蛍光分子を1光子が励起させる1光子励起過程と比べて、励起波長を2倍以上に設定することができる。そのため、可視光レーザや紫外光レーザよりも波長が長く、生体組織の透過性に優れる近赤外光レーザを用いることができる。

[0026] また、多光子励起過程は、2つ以上の光子が1つの蛍光分子にほぼ同時に衝突したときに起こる事象であるので、多光子励起過程が起きるためには、光子が時間的、場所的に集中していなければならない。そのため、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いるときの光源として、前述のように、光子を時間的に集中させることができるパルスレーザが用いられる。さらに、多光子励起過程は、レーザ光の光子が局所的に集中する焦点位置近傍で発生する。そのため、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いる場合には、必然的に、レーザ光の焦点位置近傍に位置する細胞から発せられる蛍光を観測することができる。

[0027] ブリルアン散乱顕微鏡とは、試料に光を照射した際に発生するブリルアン散乱光を利用した顕微鏡である。ここで、試料に光を照射した際に発生する

散乱光のほとんどは、照射光と同じ波長のレイリー散乱光（弾性散乱光）であるが、図2に示されるように、照射光と波長の異なる散乱光（ラマン散乱光とブリルアン散乱光）も含まれている。なお、ラマン散乱とは、分子による光との非弾性散乱である。ラマン散乱においては、光子がエネルギーの一部を試料内の分子の分子振動と交換することに起因して、レイリー散乱光の振動数（照射光の振動数）とラマン散乱光の振動数との間に差が生じる。この振動数の差は、ラマンシフトとも呼ばれる。光子がエネルギーを損失した場合のラマン散乱は「ストークス」と呼ばれ、光子がエネルギーを獲得した場合のラマン散乱は「アンチストークス」と呼ばれる。ラマン散乱光を分光したスペクトルには分子の化学結合情報が反映される。

[0028] これに対して、ブリルアン散乱は、試料中を伝搬する音波（音響フォノン）による光との非弾性散乱である。照明光の振動数とブリルアン散乱光の振動数との差（ブリルアンシフト ν_B ）は、以下の数式1で表される。なお、数式1において、 n は試料の屈折率であり、 λ は照明光の波長であり、 V は試料中の音速であり、 θ は照明光とブリルアン散乱光との角度である。試料中の音速 V は試料の弾性率 E と試料の密度 ρ を用いて、 $V = (E/\rho)^{1/2}$ と表すことができる。

[0029] [数1]

$$\nu_B = \frac{2n}{\lambda} V \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{2n}{\lambda} \sqrt{\frac{E}{\rho}} \cos\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

[0030] このように、ブリルアンシフト ν_B は、試料の弾性率 E に関連する物理量であるため、ブリルアンシフト ν_B を測定することにより、試料の弾性率 E 、すなわち、試料の硬さに関する情報を得ることができる。例えば、本実施形態においては、0.1から15GHzのシフトをブリルアンシフトとして観測し、その範囲において、シフトが観測された場合には、試料が硬くなったものとすることが可能である。

[0031] 次に、評価装置1を用いて、細胞の塊に含まれる細胞の状態を評価する方法について図3を参照しつつ説明する。ウェルWに試料S（細胞の塊）が入

ったウェルプレートWPを、ステージ161に配置する（図1参照）。顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いるように、制御部11はターレットTRを制御してダイクロイックミラーDM2を光路上に挿入する。制御部11が、光学系120の焦点深さを調整し、レーザ光の焦点位置のZ方向の位置を所定の位置に調整する。そして、制御部11が、ガルバノミラーGMの駆動を制御して、レーザ光の照射位置（焦点位置）をX-Y方向に走査しつつ、各位置において、細胞の自家蛍光を検出する。このようにして、所定のZ断面における自家蛍光の強度分布（X-Y分布）を取得する。なお、自家蛍光とは、細胞内に存在する物質が発生する蛍光のことである。次に、制御部11が、レーザ光の焦点位置のZ方向の位置を別の位置に調整し、上述と同様にして別のZ断面における蛍光の強度分布（X-Y分布）を取得する。これをZ位置の所望の範囲にわたって繰り返すことにより、自家蛍光の3次元強度分布（X-Y-Z分布）を取得する（S101）。これにより、試料S中の細胞の位置を把握することができる。なお、自家蛍光の3次元強度分布の位置分解能は、パルスレーザ101からのパルスレーザ光のスポットの大きさに依存する。本実施形態においては、XY方向の位置分解能は1～2 μm であり、Z方向の位置分解能は約5 μm である。なお、一般に細胞の大きさは10～30 μm であるので、十分な位置分解能で試料S中の細胞の位置を把握することができる。

[0032] 次に、取得した自家蛍光の3次元強度分布に基づいて、硬さを測定したい細胞の位置を特定する（S102）。制御部11は、硬さを測定したい細胞の位置に、CWレーザ102からのレーザ光が照射されるように、光学系120の焦点深さ及びガルバノミラーGMを調整する。そして、顕微鏡装置10をブリルアン散乱顕微鏡として用いるように、制御部11はターレットTRを制御してダイクロイックミラーDM2を光路上から取り除く。顕微鏡装置10は、CWレーザ102からのレーザ光を目的の細胞に照射して、細胞によって散乱されたブリルアン散乱光を第2受光部144で検出し、ブリルアンシフトを求める（S103）。制御部11は、ブリルアンシフトの大き

さから、上記の数式 1 に基づいて、細胞の硬さに関する情報を取得する（S104）。

[0033] 上記の方法においては、顕微鏡装置 10 を多光子励起顕微鏡として用いて、自家蛍光を検出して試料 S 中の細胞の位置を特定した後、顕微鏡装置 10 をブルリアン散乱顕微鏡として用いてその細胞の硬さに関する情報を取得している（図 4 参照）。自家蛍光を利用しているので、細胞を染色する必要がなく、容易に細胞を検出できる。また、先に顕微鏡装置 10 を多光子励起顕微鏡として用いて、細胞の位置を特定しているので、細胞の位置を確実に把握することができ、所望の位置の細胞の硬さに関する情報を取得することができる。なお、上記方法では、多光子励起顕微鏡を用い、自家蛍光を用いていたがこれに限られない。染色された細胞を用いても構わない。

[0034] 本実施形態においては、細胞に照射された光の散乱光を用い、細胞の硬さを評価することができる。従って、細胞の硬さを細胞に触れることなく非接触で評価することができる。これにより、計測による細胞への損傷を抑制することができる。また、細胞の塊の内部の細胞からの散乱光を受光することができるので、細胞の塊の内部の細胞の硬さを評価することができる。これにより、内部の細胞に触れることなく非接触で評価することができる。

[0035] なお、上記方法では、顕微鏡装置 10 に多光子励起顕微鏡を用い、細胞塊の内部の細胞状態を解析していたがこれに限られない。例えば、OCT (Optical Coherence Tomography: 光干渉断層撮影) でも構わない。なお、上記方法では、顕微鏡装置 10 を用い、細胞塊の内部の細胞状態を解析していたが、これに限られない。例えば、細胞塊の輪郭を撮像し、撮像された輪郭画像から、細胞の塊の直径を算出する。この場合に細胞塊を球状であるとの推定を用い、細胞の塊の中心位置を推定し、推定された中心位置における細胞の硬さに関する情報を取得しても構わない。なお、上記方法では、所望の位置にある細胞を特定し、特定された細胞について、細胞の硬さに関する情報を取得していた。しかしながら、硬さに関する情報を取得する細胞を必ずしも特定しなくてもよい。上記方法では、顕微鏡装置 10 を多光子励起顕微鏡として

用いて、自家蛍光の3次元強度分布（X-Y-Z分布）を取得している。顕微鏡装置10をブリルアン散乱顕微鏡として用いた場合にも、レーザ光の照射位置を操作することにより、ブリルアンシフトの3次元マッピングを取得することができる。自家蛍光の3次元強度分布とブリルアンシフトの3次元マッピングとを重ね合わせることで、試料Sに含まれる複数の細胞についての硬さに関する情報を取得することができる。なお、ブリルアンシフトの3次元分布の位置分解能は、CWレーザ102からのレーザ光のスポットの大きさに依存する。本実施形態においては、XY方向の位置分解能は約260nmであり、Z方向の位置分解能は約5 μ mであるので、十分な位置分解能で試料S中の細胞によって散乱されたブリルアン散乱光のブリルアンシフトを測定することができる。

[0036] なお、顕微鏡装置10の焦点距離の深さは約50 μ mまで設定することができる。細胞の塊が略球形であって、Z方向にほぼ対称であると仮定すると、約100 μ m以下の径の細胞の塊を測定対象とすることにより、細胞の塊の全体を評価することができる。そこで、自家蛍光の3次元強度分布を測定した際に、細胞の塊の径の大きさを評価して、細胞の塊の径が約100 μ m以下の細胞の塊だけを抽出して、ブリルアン散乱光のブリルアンシフトの測定を行うようにしてもよい。

[0037] また、図5に示されるように、ブリルアンシフトの大きさを横軸にしたヒストグラムを作成することにより、試料Sに含まれる複数の細胞を、その硬さに関する情報に基づいて分類することができる。細胞の硬さは、上述のように、細胞増殖や細胞死の誘導、癌細胞の転移などの細胞過程等に重要な因子であるため、細胞をその硬さに関する情報に基づいて分類することは有用である。また、図5に示されるように、ブリルアンシフトの大きさを横軸にしたヒストグラムにおいて、2つのピークが得られたとする。それぞれのピークに対応する細胞は、細胞の硬さが異なるだけでなく、別の性質（信号A、Bに対応する性質）においても、互いに異なっていることがある。例えば、細胞をその硬さで分類することにより、別の性質（例えば、細胞増殖や

細胞死の誘導、癌細胞の転移などの細胞過程における細胞の状態)においても細胞を分類することができる。

[0038] 以上説明した実施形態は、あくまでも例示であって、請求の範囲に係る発明を限定するものではない。また、上記の実施形態の中で説明された特徴の組み合わせの全てが必須であるとは限らない。また、上記実施形態には種々の変更を加えることが可能である。以下に、実施形態の変更形態について説明する。

[0039] 上記実施形態においては、1つの細胞を基本単位として、1つの細胞の硬さを評価していたが、本実施形態はそのような形態には限られない。パルスレーザ101からのパルスレーザ光のスポットの径は、1～2 μ mにすることができ、CWレーザ102からのレーザ光のスポットの径は、約260nmにすることができる。一般に細胞の中にある核の大きさは、直径約5～8 μ mであるので、パルスレーザ101からのパルスレーザ光及びCWレーザ102からのレーザ光を、1つの細胞内で、核の位置と核以外の位置とに分けて照射することが可能である。これにより、1つの細胞の内部における硬さの分布を調べることができる。特に、細胞内の核の硬さに関する情報を得ることも可能である。核の中にはDNAが収納されており、核の硬さはDNAの状態によって変わると考えられている。例えば、DNAが凝縮した状態では、DNAがバネのような役割を果たして、核の硬さを大きくすることに寄与していると考えられる。これに対して、DNAが延びたり、切れたりしている場合には、それに伴って、核の硬さが小さくなると考えられる。このように、細胞内の核の硬さに関する情報を得ることにより、核の内部に収納されているDNAの状態を評価することができる。

[0040] 上記実施形態においては、1つの細胞を基本単位として、細胞の塊に含まれる1つの細胞の硬さ又は1つの細胞の内部(核など)の硬さを評価していたが、本実施形態はそのような形態には限られない。制御部11は、光学系120を調整して、細胞の塊の中の複数の細胞に同時に照射されるように、CWレーザ102からのレーザ光のスポットの大きさを調整することができ

る。例えば、対物レンズを変えることで、対物レンズに応じてスポットの大きさを変えることが可能である。また、ガルバノミラーGMによる振り幅を変えることにより、照射する範囲を調整することが可能である。図6（a）に示されるように、CWレーザ102からのレーザ光を、細胞の塊の中の複数の細胞に同時に照射することにより、複数の細胞によって散乱されたブリルアン散乱光を受光して、複数の細胞全体としての硬さの情報を取得することができる。硬さの異なる複数の細胞によってそれぞれ散乱されたブリルアン散乱光が同時に分光器145に入るため、図6（b）に示されるように、分光されたブリルアン散乱光の振動数分布は、1つの細胞によって散乱されたブリルアン散乱光の振動数分布と比べて幅広になる。しかしながら、複数の細胞を含む領域をまとめて測定することができるため、細胞の塊全体の硬さに関する情報を取得するために必要な測定時間を短縮することができる。

[0041] 上記実施形態においては、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いて、細胞の塊に含まれる各細胞の位置情報を取得した後、顕微鏡装置10をブリルアン散乱顕微鏡として用いて、細胞の塊に含まれる細胞の硬さに関する情報を取得していた。しかしながら、本実施形態はそのような形態には限られない。例えば図7に示されるように、流路FP中を流れる細胞の塊に対して、ブリルアン散乱光を用いて細胞の硬さに関する情報を取得することができる。例えば、ウェルプレートWPに代えて、流路FPを有する公知のマイクロ流路チップを可動ステージ160に配置して、上述の手法と同様の手法により、評価装置1を用いて、ブリルアン散乱光を検出して流路中を流れる細胞の硬さに関する情報を取得することができる。これにより、複数の細胞の塊について、連続的に効率よく細胞の硬さに関する情報を取得することができる。また、この場合には、顕微鏡装置10を多光子励起顕微鏡として用いる必要はない。そのため、図7に示されるように、顕微鏡装置10は光学系120、CWレーザ102、第2受光部144を備えていればよい。

[0042] なお、上述の実施形態においては、細胞の状態の評価として、細胞の硬さを評価したが、これに限られない。ブリルアン散乱から、細胞の硬さ以外の

情報を評価しても構わない。例えば、粘性、屈折率に関する情報をブリルアン散乱より抽出し評価しても構わない。

[0043] 上記実施形態においては、顕微鏡装置 10 をブリルアン散乱顕微鏡として用いて、細胞によって散乱されたブリルアン散乱光を検出して、細胞の硬さに関する情報を取得していた。しかしながら、本実施形態はそのような形態には限られない。例えば、顕微鏡装置 10 をブリルアン散乱光ではなく、ラマン散乱光を検出するラマン散乱顕微鏡として用いて、細胞によって散乱されたラマン散乱光を検出してもよい。上述のように、ラマン散乱光を分光したスペクトルには分子の化学結合情報が含まれるので、これを用いて、細胞内に含まれる分子の状態等を評価することができる。

[0044] 上述の実施形態において、顕微鏡装置 10 の各構成要素（照明部 100、光学系 120、受光部 140、可動ステージ 160）の構造、配置等は適宜変更しうる。例えば、上記実施形態においては、光学系 120 について具体的な光学素子を示しつつ説明したが、本教示はこのような形態には限られず、光学系 120 を構成する光学素子の数、種類、配置等を適宜変更しうる。例えば、上記実施形態においては、CW レーザ 102 からのレーザ光と、パルスレーザ 101 からのレーザ光とが同じ光路を進むように構成されていたが、本実施形態はそのような形態には限られない。例えば、CW レーザ 102 からのレーザ光と、パルスレーザ 101 からのレーザ光とが、別々の光路を進むように構成されていてもよい。また、上記実施形態においては、 $\lambda/2$ 位相差板 HWP、偏光ビームスプリッタ PBS、 $\lambda/4$ 位相差板 QWP が、レンズ L2 とガルバノミラー GM1 との間に配置されていたが、本実施形態はそのような形態には限られない。例えば、図 8 に示されるように、ミラー M2 と偏光ビームスプリッタ PBS を入れ替えて、偏光ビームスプリッタ PBS の上流及び下流に、それぞれ、 $\lambda/2$ 位相差板 HWP 及び $\lambda/4$ 位相差板 QWP を配置してもよい。この場合にも、試料 S において散乱した散乱光は偏光ビームスプリッタ PBS を透過することができる。なお、レンズ L5、ピンホール PH、第 2 受光部 144 は、図 8 のように偏光ビームスプリ

ッタPBSの下流側に配置することにより、偏光ビームスプリッタPBSを透過した散乱光を第2受光部144に導くことができる。

[0045] 上記実施形態及びその変更形態においては、制御部11が、レーザ光を各位置に照射したときに、受光部140で観測される蛍光の強度及びブリルアンシフトを用いて、蛍光の強度分布及びブリルアンシフトの3次元マッピングを取得していた。上述のように、取得された3次元マッピングの画像は、表示部12に表示することができる。以下に、その一例について説明する。

[0046] 図9(a)は、細胞の塊の、所定の断面における断面図を図示したものである。図9(a)に示される細胞の塊の断面図においては、細胞の塊の中心からの距離に応じて5つの領域(領域91~95)に分割されている。図9(b)は、領域91~95について、各領域の位置(中心からの距離)と、各領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをプロットしたグラフである。なお、単に画面に表示されている1つの断面の各領域に含まれる細胞だけではなく、細胞の塊の他の断面の各領域に含まれる細胞も対象にして、ブリルアンシフトのシフト量の平均値を算出している。図9(c)は、領域91~95のうちの1つの領域の中の複数の小領域(ここでは領域95の中の、3つの小領域951~953)について、各小領域の位置と、各小領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをさらにプロットしたグラフである。図9(d)は、細胞の塊に含まれる、細胞の1つについて測定したときのブリルアン散乱光の振動数分布を示したスペクトルである。図9(e)は、細胞の塊に含まれる1つの細胞について、多光子励起顕微鏡で自家蛍光を測定することによって得られた、細胞の外形を示す画像であり、図9(f)は、図9(e)の画像にブリルアンシフトのシフト量の分布を重ね合わせた合成画像である。

[0047] 表示部12は、図9(a)~9(f)に示されるような図又はプロットを、少なくとも1つ表示することができる。例えば、図10に示されるように、表示部12は、4分割した画面にそれぞれ別の情報を表示することができ

る。図10に示される画面1は、表示部12の画面を左右に2分割したうちの、左半分の画面に対応する。画面2は、画面1の右側の画面をさらに上下に2分割したうちの、上側の画面に対応する。画面3は、画面2の下側の画面をさらに左右に2分割したうちの、左側の画面に対応する。画面4は、画面3の右側の画面に対応する。図10に示されるように、画面1には、図9(a)に示されるような、細胞の塊の断面図が表示される。画面1に表示される細胞の塊の断面図は、前述のように、5つの領域に分割されている。画面2には、図9(b)に示されるような、各領域の位置（中心からの距離）と、各領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをプロットしたグラフが表示される。

[0048] 画面1又は画面2において、各領域及び各領域に対応する凡例は、マウスでクリックしたり、タッチパネルでタッチしたりすることによって、選択することができる。図10においては、画面2の点線で囲まれた部分（細胞の塊の最も外側の領域に対応）が選択されている。これに伴って、画面3には、図9(d)に示されたような、選択された領域に含まれる細胞の1つの、ブリルアン散乱光の振動数分布を示したスペクトルが表示され、画面4には、図9(f)に示されたような、その細胞の外形を示す画像に、測定されたブリルアンシフトのシフト量の分布を重ね合わせた画像が表示される。なお、画面3及び画面4には、選択された領域におけるブリルアンシフトのシフト量の平均値とほぼ同じシフト量が検出された細胞において実際に測定されたスペクトル及び画像が表示される。

[0049] ユーザは、画面1に表示される図及び画面2に表示されるプロットによって、細胞の塊の各領域における、ブリルアンシフトのシフト量を確認することができる。また、ユーザは、所望の領域を選択することにより、その領域に含まれる細胞の1つについての測定データ（ブリルアン散乱光の振動数分布及びブリルアンシフトのシフト量の分布）を確認することができる。

[0050] なお、図10においては、画面が4分割されていたが、これはあくまでも例示であり、本発明はそのような態様には限られない。例えば、画面は分割

されていなくてもよく、任意の数に分割されていてもよい。また、例えば、最初は2分割された画面に、画面1及び画面2のみが表示されてもよく、ユーザが領域を選択することに応じて、画面が4分割されて、画面3及び画面4がさらに表示されてもよい。

[0051] 画面1に表示される細胞の塊の断面図においては、細胞の塊の断面を円で表され、その1/4の円で表示されているが、これは例示にすぎない。例えば、細胞の塊の断面が、細胞の塊の外形に応じた形状で図示されてもよい。また、細胞の塊の断面全体の形状が表示されてもよく、細胞の塊の断面全体のうちの、任意の割合の部分の形状が表示されてもよい。また、画面1に表示される細胞の塊の断面図においては、細胞の塊の断面が同心円状の5つの領域に分割されていたが、これも例示に過ぎない。例えば、表示部12は、細胞の塊の大きさに応じて、細胞の塊の断面の分割領域の数を増減することができる。また、表示部12は、各分割領域の形状も任意に設定することができる。

[0052] 画面2においては、各領域の位置（中心からの距離）と、各領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをプロットしたグラフが表示されていた。上述のように、単に画面に表示されている1つの断面の各領域に含まれる細胞だけではなく、細胞の塊の他の断面の各領域に含まれる細胞も対象にして、ブリルアンシフトのシフト量の平均値が算出されていた。しかしながら、これはあくまでも例示であり、画面に表示されている1つの断面の各領域に含まれる細胞だけを対象にして、ブリルアンシフトのシフト量の平均値が算出されてもよい。このとき、表示部12は、画面2において、図9（c）に示されるような、ユーザが選択した複数の小領域951～953について、各小領域の位置と、各小領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをさらにプロットしたグラフを表示することもできる。これにより、表示部12は、ユーザが選択した断面の、任意の位置でのブリルアンシフトのシフト量を表示することができる。

- [0053] なお、制御部 11 は、ブリルアンシフトのシフト量の平均値を算出する際に、所定範囲を外れたシフト量はノイズとして取り除いて、所定範囲内にあるものだけを対象にして平均値を算出してもよい。また、ブリルアンシフトのシフト量の平均値に代えて、あるいは、ブリルアンシフトのシフト量の平均値に加えて、制御部 11 は、ブリルアンシフトのシフト量の中央値、最頻値を算出して表示部 12 に表示させてもよい。
- [0054] 上述のように、画面 3 及び画面 4 には、選択された領域におけるブリルアンシフトのシフト量の平均値とほぼ同じシフト量が検出された細胞において測定されたスペクトル及び画像が表示されていたが、これはあくまでも例示に過ぎない。例えば、制御部 11 は、選択された領域に含まれる複数の細胞で測定されたスペクトル及び画像から、平均のスペクトル及び平均の画像を算出し、表示部 12 に表示させてもよい。
- [0055] 図 10 においては、複数の領域に分割された細胞塊の断面図と、分割された各領域に含まれる細胞において測定された、ブリルアンシフトのシフト量の平均値とをプロットしたグラフが表示されていたが、これは、あくまでも例示に過ぎない。例えば、表示部 12 は、図 11 の画面 1 に示されるように、ブリルアンシフトのシフト量を段階的に区分けして、各シフト量に対応する領域が、細胞の塊の断面のどの位置にあるかを示す図を表示することができる。ここで、図 11 の画面 2 には、画面 1 で示されている断面について、多光子励起顕微鏡で自家蛍光を測定することによって得られた画像が表示される。細胞に含まれる所定のタンパク質から放出される蛍光を測定している場合には、画面 2 に表示される画像は、所定のタンパク質の局在化を示す画像であるといえる。画面 1 と画面 2 とを比較することにより、ブリルアンシフトのシフト量の分布と、所定のタンパク質の分布とを比較することができる。また、生きている細胞のみから放出される蛍光を測定している場合には、画面 2 に表示される画像は、生きている細胞の分布を示す画像であるといえる。画面 1 と画面 2 とを比較することにより、ブリルアンシフトのシフト量の分布と、生きている細胞の分布とを比較することができる。なお、表示

部 1 2 は、画面 1 と画面 2 とを重ね合わせた合成画像を表示することもできる。また、表示部 1 2 は、画面 1 と画面 2 とで一致していない部分がある場合には、その部分を削除して表示することもできる。

[0056] 以上、添付図面を参照しながら、本発明に係る好適な実施形態や変形例について説明したが、本発明は係る例に限定されないことは言うまでもない。上述した例において示した各構成部材の諸形状や組み合わせ等は一例であって、本発明の主旨から逸脱しない範囲において設計要求等に基づき種々変更可能である。前述の実施形態の各構成要素は、適宜組み合わせることができる。また、一部の構成要素を用いない場合もある。また、法令が許容される限りにおいて、前述の各実施形態及び変形例などに関するすべての公開広報および米国特許の開示を援用して本文の記載の一部とする。前述した実施形態に基づいて当業者等によりなされる他の実施形態及び運用技術等は、すべて本実施形態の範囲に含まれる。

符号の説明

- [0057]
- | | |
|-------|--------|
| 1 | 評価装置 |
| 1 0 | 顕微鏡装置 |
| 1 1 | 制御部 |
| 1 2 | 表示部 |
| 1 3 | 入力部 |
| 1 0 0 | 照明部 |
| 1 2 0 | 光学系 |
| 1 4 0 | 受光部 |
| 1 6 0 | 可動ステージ |

請求の範囲

- [請求項1] 細胞の塊に含まれる細胞の位置情報を取得する取得部と、
前記細胞の位置情報に基づいて照射される光の散乱光を受光する受光部を備える、評価装置。
- [請求項2] 前記取得部は、前記細胞の塊に含まれる前記細胞の像を撮像する撮像部を備え、
前記撮像部により撮像された前記像に基づいて前記細胞の位置情報を取得する、請求項1に記載の評価装置。
- [請求項3] 前記受光部は、前記細胞とは異なる部分からの散乱光の受光を抑制する遮蔽部を備える、請求項1または2に記載の評価装置。
- [請求項4] 前記受光部からの散乱光に関する信号に基づいて、前記細胞の状態を評価する評価部を備える、請求項1から3のいずれか一項に記載の評価装置。
- [請求項5] 前記評価部は、前記細胞の状態を用いて、前記細胞の塊の状態を評価する、請求項4に記載の評価装置。
- [請求項6] 細胞の塊に照射された光の、前記細胞の塊に含まれる細胞による散乱光を受光する受光部と、
前記受光部からの散乱光に関する信号に基づいて、前記細胞の状態を評価する評価部を備える、評価装置。
- [請求項7] 前記散乱光は、ブリルアン散乱により散乱されたブリルアン散乱光である、請求項5又は6に記載の評価装置。
- [請求項8] 前記評価部は、前記細胞の照射される光の波長と、前記受光部で受光するブリルアン散乱の波長差に基づいて、前記細胞の硬さを評価する、請求項7に記載の評価装置。
- [請求項9] 前記評価部は、前記評価した前記細胞の塊に含まれる前記細胞の硬さに基づいて、前記細胞の塊に含まれる前記細胞を分類する、請求項8に記載の評価装置。
- [請求項10] 前記評価部は、前記波長差に基づいて、前記細胞の塊に含まれる前

記細胞の核の硬さを評価する、請求項 8 または請求項 9 に記載の評価装置。

[請求項11] 前記評価部は、前記評価した、前記細胞の塊の中に含まれる前記細胞の前記核の硬さに基づいて、前記細胞の塊の中に含まれる前記細胞を分類する、請求項 10 に記載の評価装置。

[請求項12] 前記細胞の位置情報と、前記細胞の硬さ情報とに基づいて、前記細胞の硬さの分布図を作成する作成部を備える、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の評価装置。

[請求項13] 前記受光部は、前記細胞の塊に含まれる複数の細胞からの散乱光を受光し、

前記評価部は、前記受光部からの散乱光に関する信号に基づいて、前記複数の細胞の状態を評価する、請求項 5 ～ 12 のいずれか一項に記載の評価装置。

[請求項14] さらに、前記細胞の塊が流れる流路を備え、

前記照射部は、前記流路を流れる前記細胞の塊に前記光を照射し、

前記受光部は、前記流路を流れる前記細胞の塊又は前記流路を流れる前記細胞の塊の中に含まれる細胞で散乱された前記散乱光を受光する、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の評価装置。

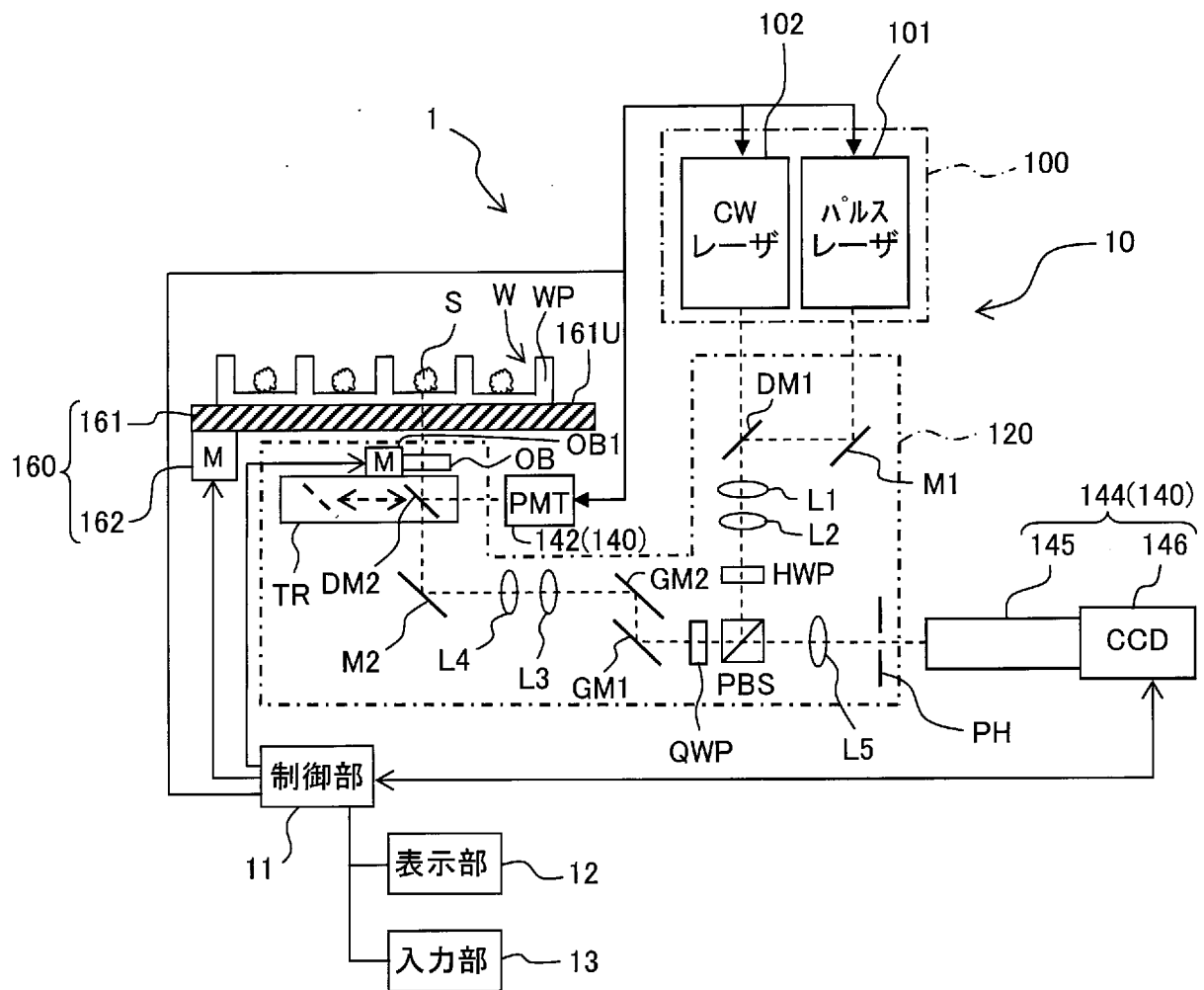
[請求項15] 細胞の塊に含まれる細胞の位置情報を取得することと、

前記細胞の位置情報に基づいて照射される光の散乱光を受光することと、を備える、評価方法。

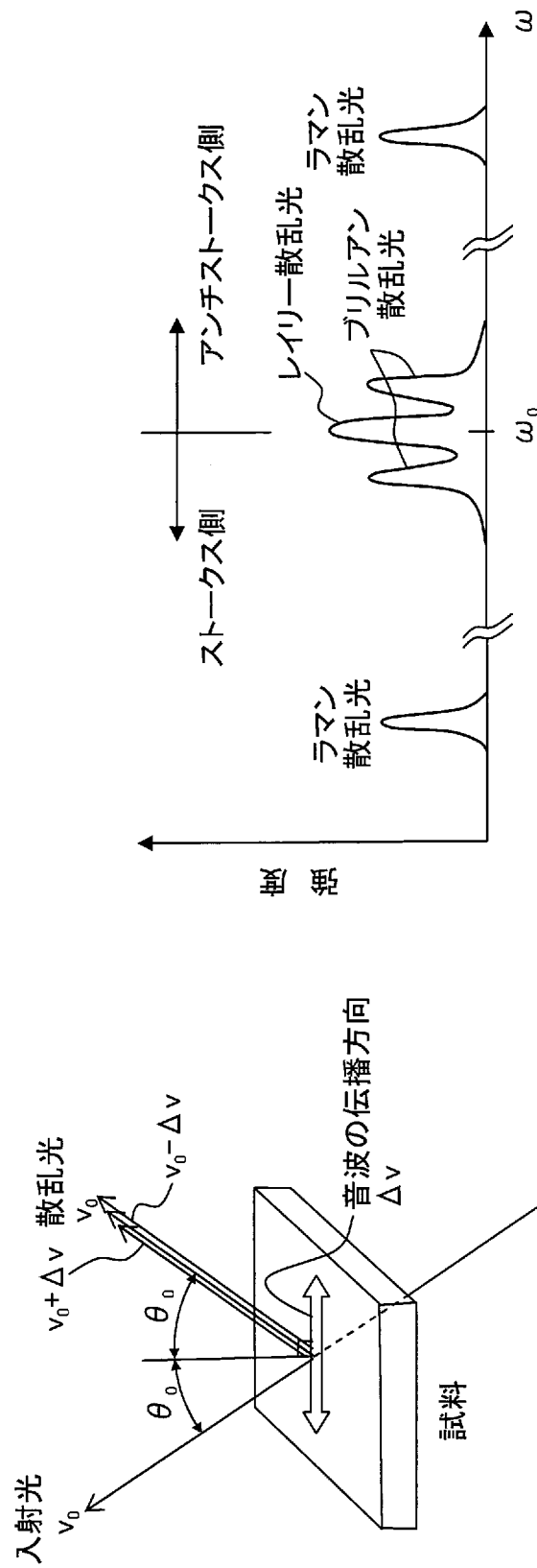
[請求項16] 細胞の塊に照射された光の、前記細胞の塊に含まれる細胞による散乱光を受光することと、

前記受光した散乱光に関する信号に基づいて、前記細胞の状態を評価することと、を備える、評価方法。

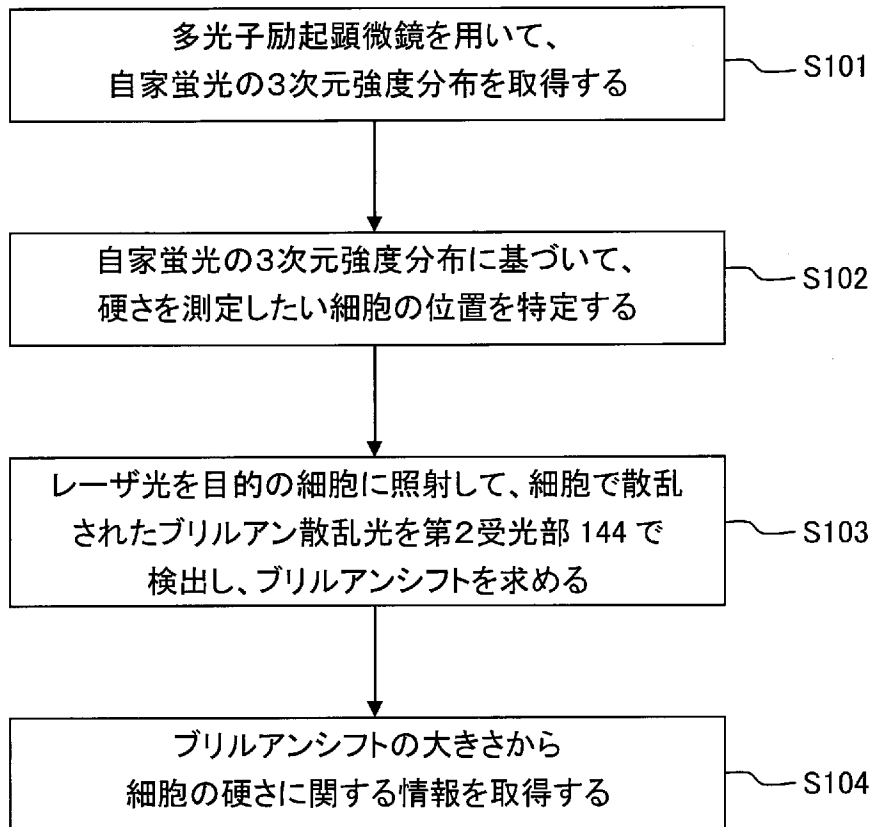
[図1]



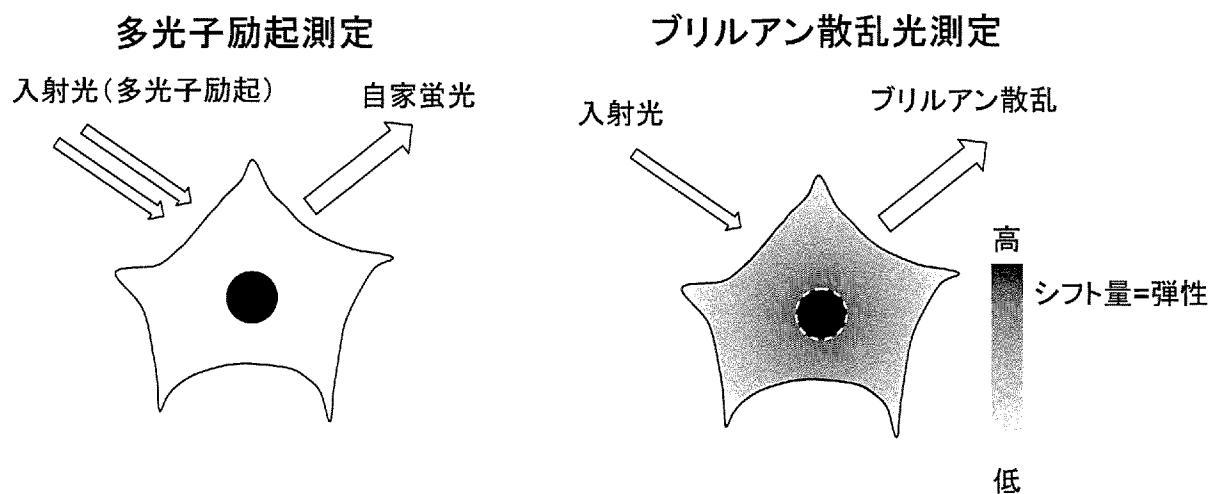
[図2]



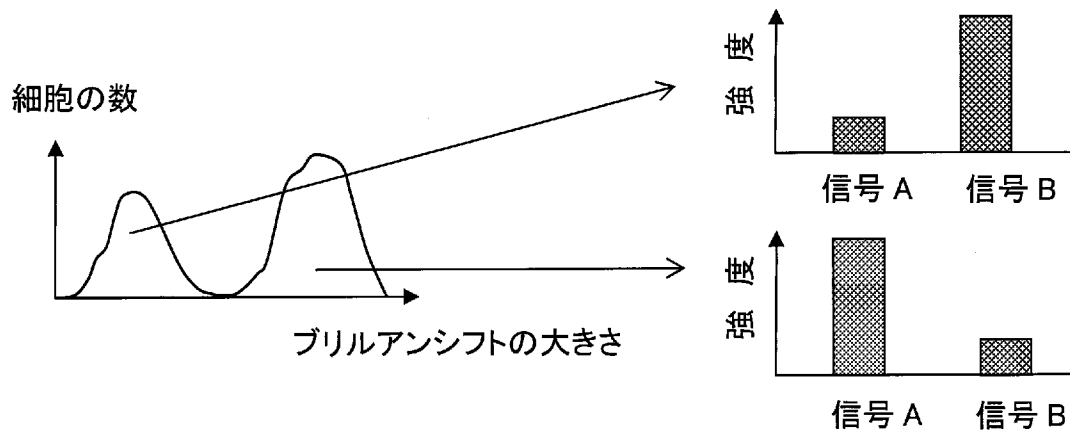
[図3]



[図4]

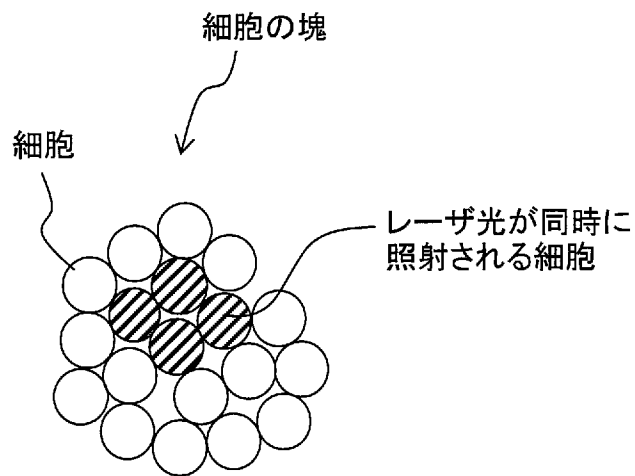


[図5]

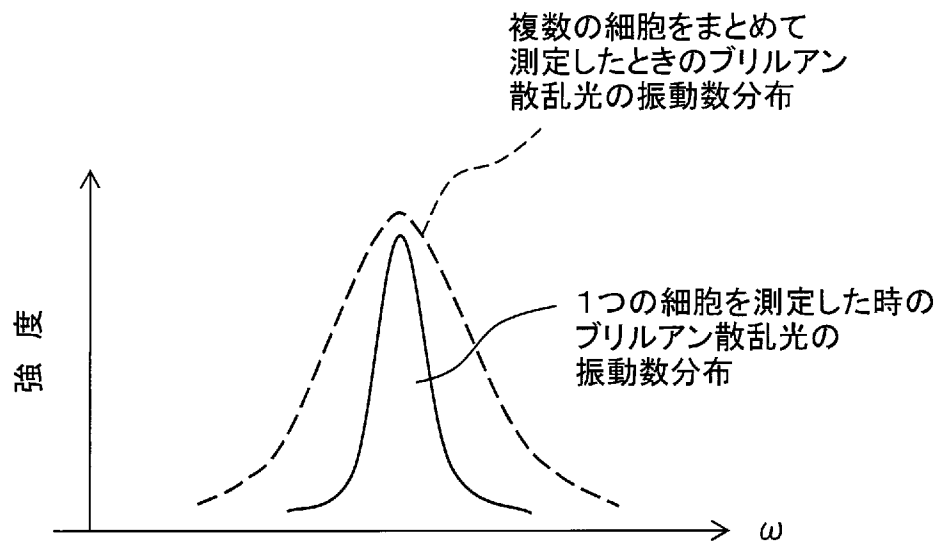


[図6]

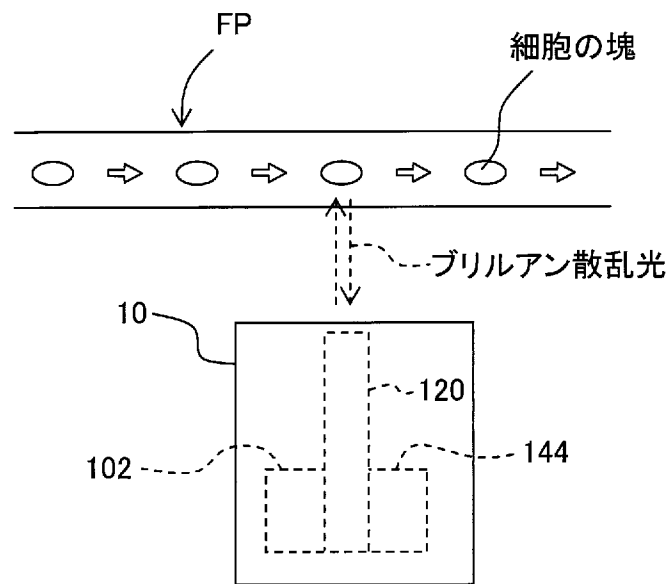
(a)

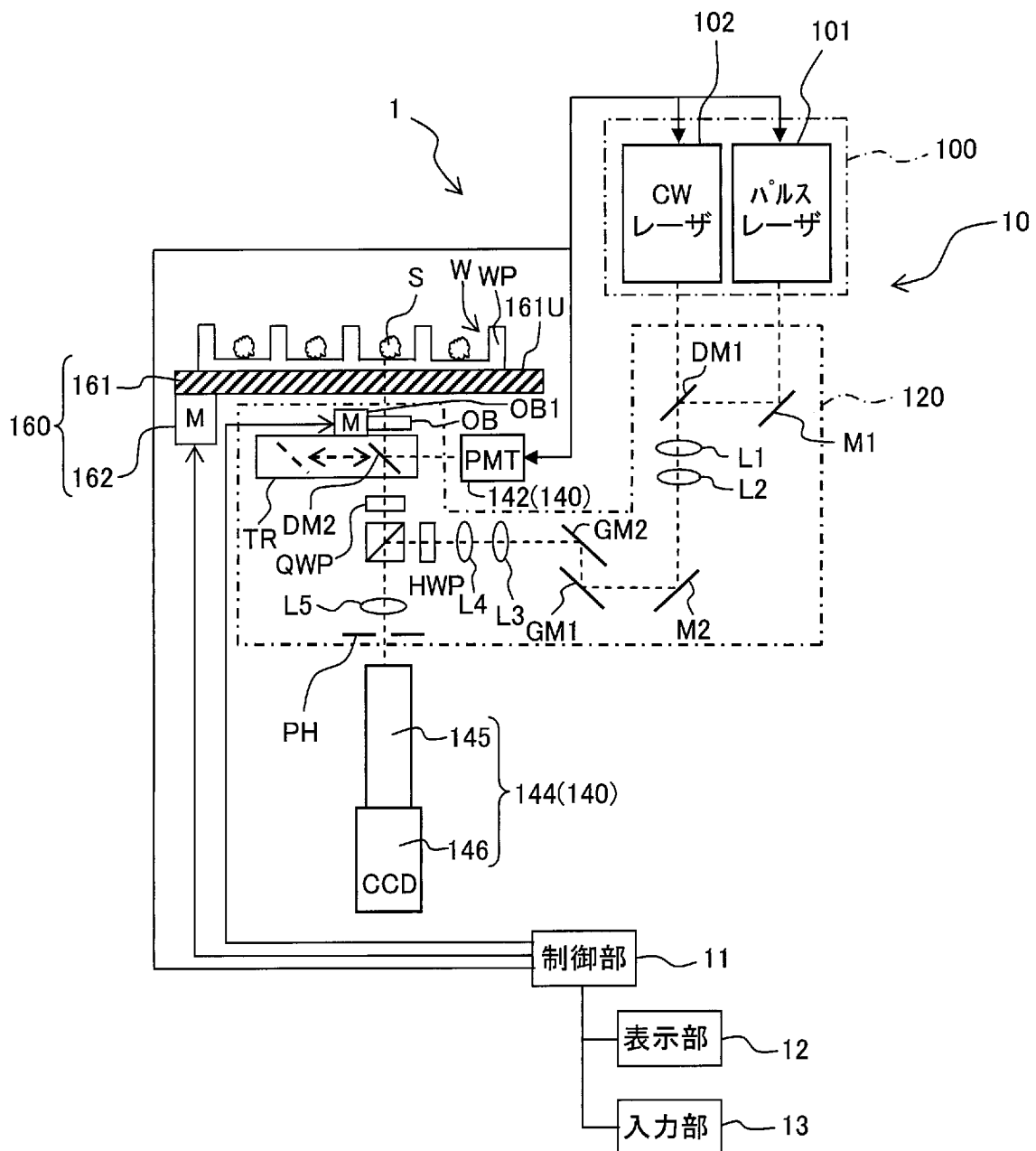


(b)

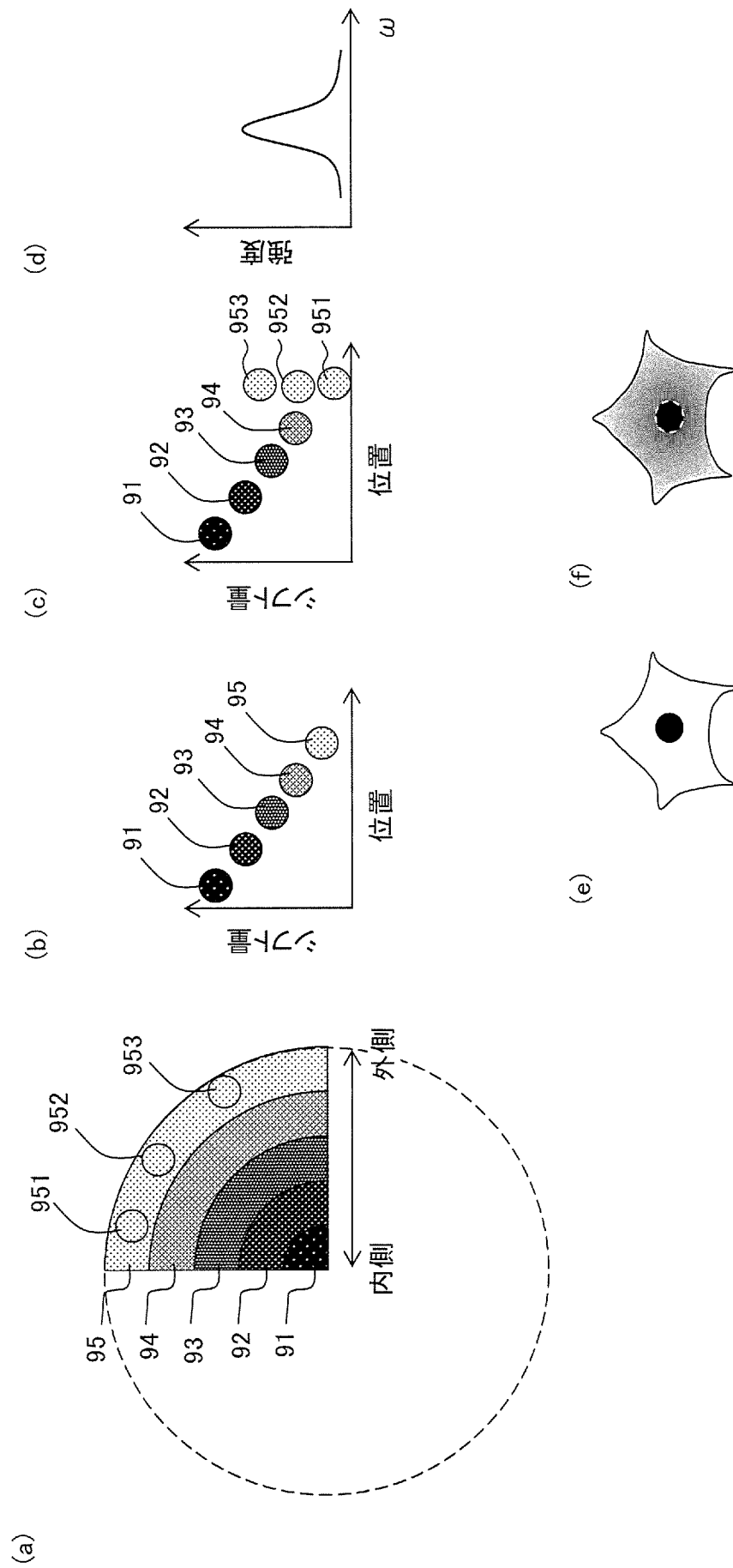


[図7]

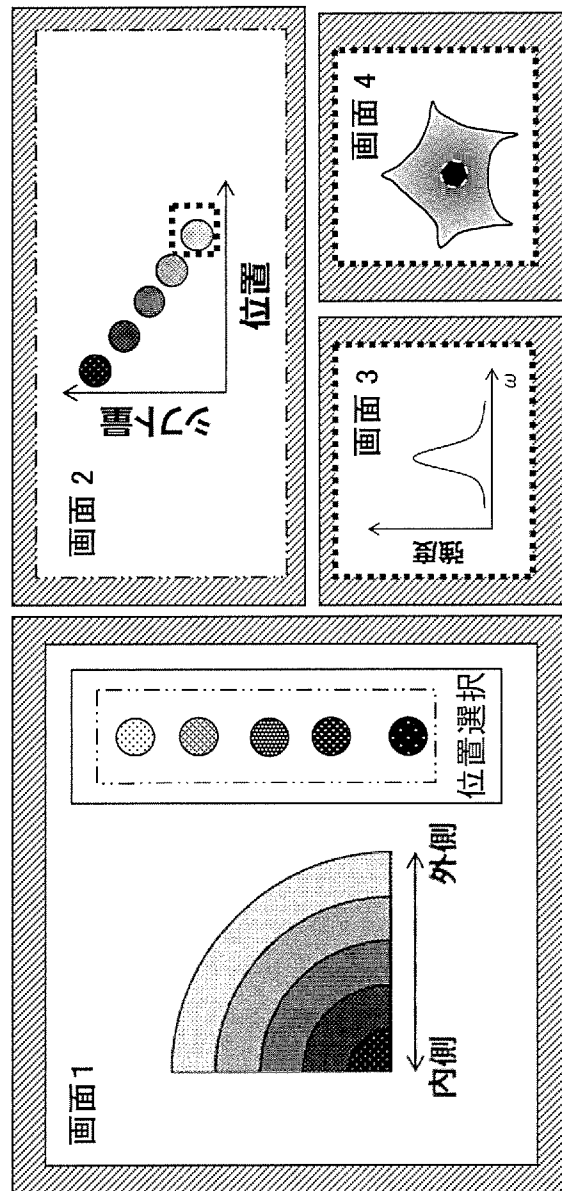




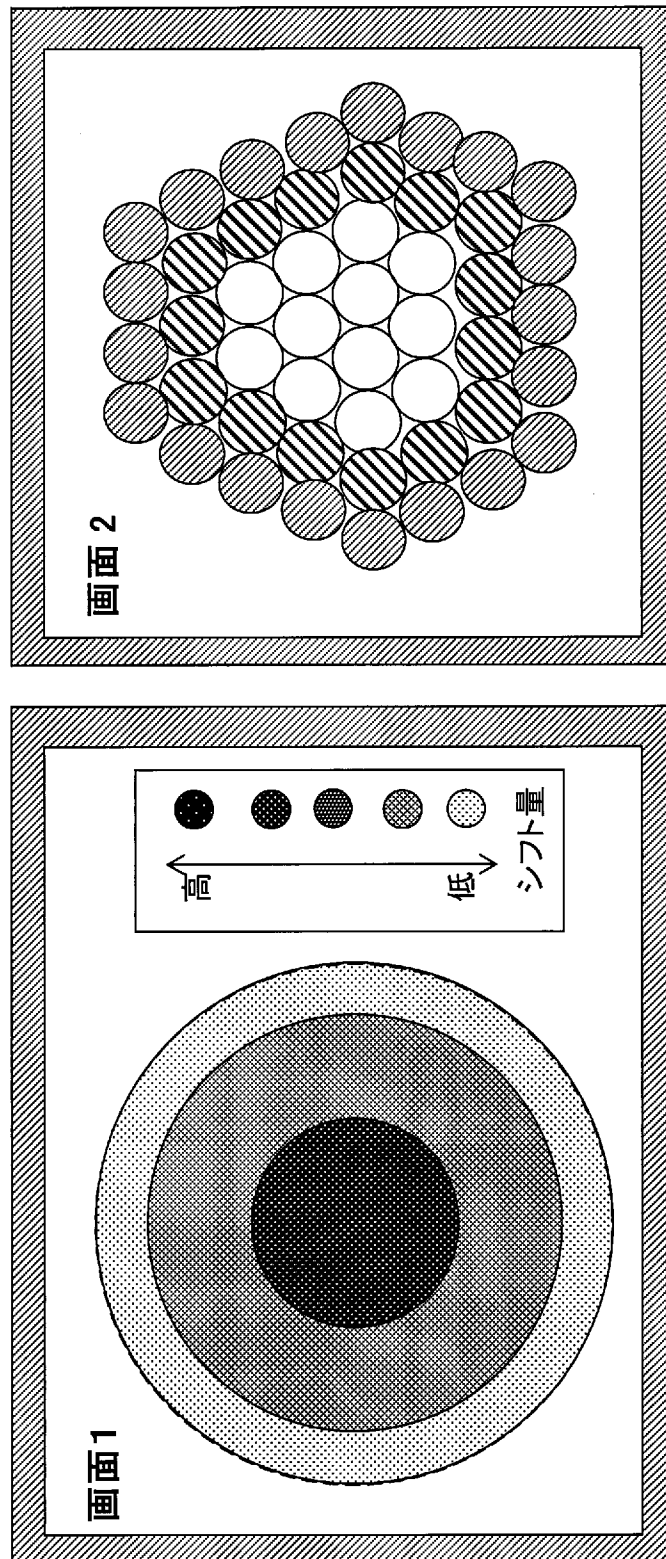
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/048568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N21/63(2006.01)i, C12M1/34(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)

Int.Cl. G01N21/00-21/958, C12M1/00-1/42, G01N1/00-1/44, G01N15/00-15/14, G01N27/26-27/49, G01N33/00-33/98, G01N35/00-35/10, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Science Direct, IEEE Xplore, ACS PUBLICATIONS, nature.com, SCIENCE, Scitation, SPIE Digital Library, OSA Publishing, arXiv, bioRxiv, Research Gate, APS Journals

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2018/226863 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND, COLLEGE PARK) 13 December 2018, paragraphs [0002], [0009]-[0016], [0094]-[0108], [0133]-[0141], [0167]-[0172], fig. 1-6, 12, 17-21, 32-34 (Family: none)	1-16 14
X Y	Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy, Nature Methods, 05 October 2015, vol. 12, pp. 1132-1134, doi:10.1038/nmeth.3616	1-9 13, 15-16 10-12, 14

☒ 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

"I" 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
28 January 2019 (28.01.2019)

Date of mailing of the international search report
12 February 2019 (12.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/048568

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	All-optical mapping of the mechanical properties of cells, SPIE Newsroom, 21 March 2017, doi:10.117/2.1201611.006698	1-9 13, 15-16
Y		10-12, 14
X	WO 2007/034802 A1 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.) 29 March 2007, paragraphs [0017]-[0032], fig. 1-6 & US 2009/0073453 A1, paragraphs [0032]-[0049], fig. 1-6	1-9 13, 15-16
Y		10-12, 14
Y	Brillouin microscopy, ADVANCES IN OPTICS FOR BIOTECHNOLOGY, MEDICINE AND SURGERY XV, 22 December 2017, [retrieval date 30 January 2019]	10-12
Y	Quantification of plaque stiffness by Brillouin microscopy in experimental thin cap fibroatheroma, Journal of The Royal Society Interface, 15 November 2015, vol. 12, issue 112, pp. 1-4, doi:10.1098/rsif.2015.0843	10-12
A	US 2009/0323056 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 31 December 2009 & WO 2008/137637 A2	1-16
A	Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy, SCIENTIFIC REPORTS, 15 November 2016, 6:37217, pp. 1-6, doi:10.1038/srep37217	1-16
A	Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy, bioRxiv, 10 December 2018, bioRxiv 494803, pp. 1-12, doi:10.1101/491803	1-16
A	Mapping the subcellular mechanical properties of live cells in tissues with fluorescence emission-Brillouin imaging, SCIENCE SIGNALING, 05 July 2016, vol. 9, issue 435, pp. 1-12, doi:10.1126/scisignal.aaf6326	1-16
A	Brillouin microscopy, what is it really measuring?, q-bio.QM, 14 May 2018, arXiv:1711.03312v2[q-bio.QM], doi:10.1038/s41592-018-0076-1	1-16
A	Dual Raman-Brillouin Microscope for Chemical and Mechanical Characterization and Imaging, Analytical Chemistry, 21 July 2015, vol. 87, pp. 7519-7523, doi:10.1021/acs.analchem.5602104	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/63(2006.01)i, C12M1/34(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. G01N21/00-21/958, C12M1/00-1/42,
G01N1/00-1/44, G01N15/00-15/14, G01N27/26-27/49, G01N33/00-33/98, G01N35/00-35/10, G01N37/00

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Science Direct, IEEE Xplore, ACS PUBLICATIONS, nature.com, SCIENCE, Scitation, SPIE Digital Library, OSA Publishing, arXiv, bioRxiv, Research Gate, APS Journals

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
X Y	WO 2018/226863 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND, COLLEGE PARK) 2018.12.13, [0002], [0009]-[00016], [00094]-[000108], [000133]-[000141], [000167]-[000172], Figs. 1-6, Fig. 12, Figs. 17-21, Figs. 32-34 (ファミリーなし)	1-16 14
X Y	Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy, Nature Methods, 2015.10.05, Vol. 12, pp. 1132-1134, doi: 10.1038/nmeth.3616	1-9, 13, 15-16 10-12, 14

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

28.01.2019

国際調査報告の発送日

12.02.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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)

嶋田 行志

2W

8353

電話番号 03-3581-1101 内線 3257

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
X Y	All-optical mapping of the mechanical properties of cells, SPIE Newsroom, 2017.03.21, doi: 10.117/2.1201611.006698	1-9, 13, 15-16 10-12, 14
X Y	WO 2007/034802 A1 (住友電気工業株式会社) 2007.03.29, [0017] - [0032]、図1 - 図6 & US 2009/0073453 A1, [0032]-[0049], Figs. 1-6	1-9, 13, 15-16 10-12, 14
Y	Brillouin microscopy, ADVANCES IN OPTICS FOR BIOTECHNOLOGY, MEDICINE AND SURGERY XV, 2017.12.22, 2019年1月30日検索日	10-12
Y	Quantification of plaque stiffness by Brillouin microscopy in experimental thin cap fibroatheroma, Journal of The Royal Society Interface, 2015.11.15, Volume 12, Issue 112, pp. 1-4, doi: 10.1098/rsif.2015.0843	10-12
A	US 2009/0323056 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2009.12.31, & WO 2008/137637 A2	1-16
A	Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy, SCIENTIFIC REPORTS, 2016.11.15, 6:37217, pp. 1-6, doi: 10.1038/srep37217	1-16
A	Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy, bioRxiv, 2018.12.10, bioRxiv 494803, pp. 1-12, doi: 10.1101/491803	1-16
A	Mapping the subcellular mechanical properties of live cells in tissues with fluorescence emission-Brillouin imaging, SCIENCE SIGNALING, 2016.07.05, Vol. 9, Issue 435, pp. 1-12, doi: 10.1126/scisignal.aaf6326	1-16
A	Brillouin microscopy, what is it really measuring?, q-bio.QM, 2018.05.14, arXiv:1711.03312v2[q-bio.QM], doi: 10.1038/s41592-018-0076-1	1-16
A	Dual Raman-Brillouin Microscope for Chemical and Mechanical Characterization and Imaging, Analytical Chemistry, 2015.07.21, Vol. 87, pp. 7519-7523, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02104	1-16