

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-147400

(P2011-147400A)

(43) 公開日 平成23年8月4日(2011.8.4)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 B 0 2 9	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 6 3
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	B	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2010-12125 (P2010-12125)
 (22) 出願日 平成22年1月22日 (2010.1.22)

(71) 出願人 504300181
 国立大学法人浜松医科大学
 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
 (71) 出願人 000236436
 浜松ホトニクス株式会社
 静岡県浜松市東区市野町1126番地の1
 (74) 代理人 100088155
 弁理士 長谷川 芳樹
 (74) 代理人 100092657
 弁理士 寺崎 史朗
 (74) 代理人 100124291
 弁理士 石田 悟
 (72) 発明者 寺川 進
 静岡県浜松市東区半田山1丁目20番1号
 国立大学法人浜松医科大学内
 最終頁に続く

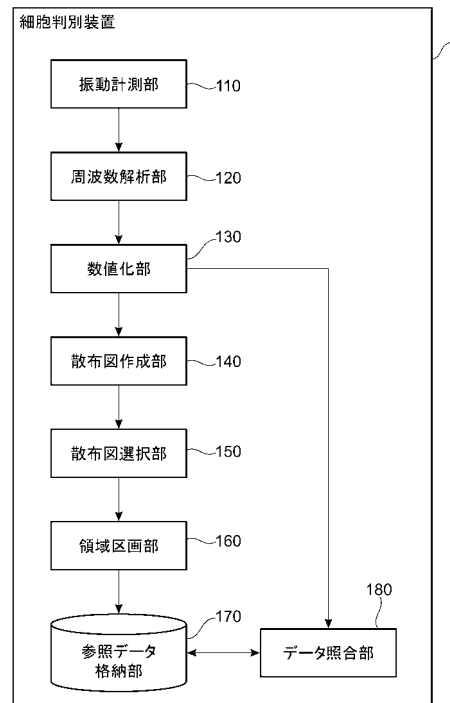
(54) 【発明の名称】 細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置

(57) 【要約】

【課題】 細胞を非侵襲且つ高精度で判別すること

【解決手段】 被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成ステップと、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して周波数解析を行った結果を、参照データ生成ステップにて生成された参照データと照らし合わせることにより、被検体の細胞を判別する細胞判別ステップと、を備える。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、前記細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成ステップと、

前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して前記周波数解析を行った結果を、前記参照データ生成ステップにて生成された前記参照データと照らし合わせることにより、前記被検体の前記細胞を判別する細胞判別ステップと、

を備えることを特徴とする細胞判別方法。

10

【請求項 2】

前記参照データ生成ステップは、

前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する振動計測ステップと、

前記振動計測ステップにおける当該計測結果に対して前記周波数解析を行う周波数解析ステップと、

前記周波数解析ステップにおける当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化ステップと、

前記数値化ステップにおける当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成ステップと、

20

前記散布図作成ステップにて作成された前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画ステップと、

を備え、

前記参照データは、前記領域区画ステップにて当該領域区画された当該散布図である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の細胞判別方法。

【請求項 3】

前記振動計測ステップでは、前記細胞に設けられた複数の計測領域に対してそれぞれ当該計測を行い、

前記周波数解析ステップでは、それぞれの前記計測領域の当該計測結果に対して前記周波数解析を行い、且つ当該周波数解析結果を平均化することにより前記細胞全体としての周波数解析結果を得る、

30

ことを特徴とする請求項 2 に記載の細胞判別方法。

【請求項 4】

前記周波数解析ステップでは、周波数およびパワースペクトルにより前記周波数解析が行われ、

前記数値化ステップでは、前記周波数に対する前記パワースペクトルの値を近似化した近似線、および前記近似線における傾きを求め、

前記散布図作成ステップでは、前記傾きを一の軸とし且つ所定の周波数における前記パワースペクトルの値を他の軸とする 2 次元上に、前記傾きに対して前記パワースペクトルの値を前記被検体の前記細胞ごとにプロットした図を、前記散布図として作成する、

40

ことを特徴とする請求項 2 または 3 に記載の細胞判別方法。

【請求項 5】

前記散布図作成ステップでは、複数の前記所定の周波数に応じて複数の前記散布図が作成され、

当該複数の前記散布図のうち、プロットされた前記パワースペクトルの値における決定係数の値が所定の値以下である前記散布図を、前記領域区画ステップにて当該領域区画される前記散布図として選択する散布図選択ステップを更に備える、

ことを特徴とする請求項 4 に記載の細胞判別方法。

【請求項 6】

前記領域区画ステップにおける当該領域区画は、前記散布図上で区画線を設定すること

50

により行われる、

ことを特徴とする請求項 2 ~ 5 の何れか 1 項に記載の細胞判別方法。

【請求項 7】

細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する振動計測ステップと、

前記振動計測ステップにおける当該計測結果に対して周波数解析を行う周波数解析ステップと、

前記周波数解析ステップにおける当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化ステップと、

前記数値化ステップにおける当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成ステップと、

前記散布図作成ステップにて作成された前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画ステップと、

を備えことを特徴とする細胞判別用の参照データ生成方法。

【請求項 8】

被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、前記細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成手段と、

前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して前記周波数解析を行った結果を、前記参照データ生成手段が生成した前記参照データと照らし合わせることにより、前記被検体の前記細胞を判別する細胞判別手段と、

を備えることを特徴とする細胞判別装置。

【請求項 9】

前記参照データ生成手段は、

前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する振動計測手段と、

前記振動計測手段による当該計測結果に対して前記周波数解析を行う周波数解析手段と

、前記周波数解析手段による当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化手段と、

前記数値化手段による当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成手段と、

前記散布図作成手段が作成した前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画手段と、

を備え、

前記参照データは、前記領域区画手段が当該領域区画した当該散布図である、

ことを特徴とする請求項 8 に記載の細胞判別装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

規則正しく振動する細胞の代表的な一例として、心筋細胞がある。しかし、一般的に、細胞の多くは心筋細胞のように規則的に振動するわけではないので（例えば、下記の非特許文献 1 を参照）、細胞の振動に伴う規則的な周波数を用いた細胞判別は、一般的な細胞には適用できない。

【0003】

また、蛍光ラベルをせずに、生細胞の細胞膜の状態を測定する技術として、例えば走査型プローブ顕微鏡（SPM；Scanning probe microscope）や、原子間力顕微鏡（AFM；Atomic force microscope、下記の非特許文献 2 を参照）などが知られている。いずれもプローパーであるカンチレバーを細胞に接触あるいはオングストローム単位で接近させて細胞全

10

20

30

40

50

体をスキャンする方式であるが、このような装置を用いて細胞判別を行うには以下のような問題点が存在する。すなわち、測定には細胞に機械的応力を加えることが必要であるため、細胞への影響を避けられない。また、生きた細胞を簡便に測定するにはある程度の熟練を要する。更に、1個1個の細胞をカンチレバーで走査する必要があるために、複数の細胞について細胞膜の変位の時間変化を計測するには長時間がかかり、現実的でない。更にまた、細胞膜の変動を指標とした細胞の識別や状態の把握にまで踏み込んだ技術はまだ公開されていない。特に、細胞診断への応用を考えた際に、生細胞に対して非侵襲で計測を実現することが重要であるが、上記の従来技術はその要件を満たしていない。

【0004】

一方で、光学顕微鏡における位相差コントラスト観察や微分干渉コントラスト観察は細胞の形態を非侵襲で光学的に観察する手段として広く利用されている。しかしながら、上記の観察方法によると、細胞内の構造の変化は明瞭に観察できるが、細胞膜の状態を例えばナノメートルの高精度で計測することはできない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Jan Domke, "Mapping the mechanical pulse of signal cardiomyocytes with the atomic force microscope", Eur. Biophys. J, 28, 179, 1999

【非特許文献2】Balint Szabo, "Atomic force microscopy of height fluctuations of fibroblast cells", Phy. Review E, 65, 041910, 2002

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ここで、上記の非特許文献2によれば、原子間力顕微鏡(以下、AFM)を用いる場合には細胞の高さの変動をナノメートルスケールの高精度で捉えることができるとされている。その一方で、細胞1つにおける各部位の高さ方向の変動の様子の差異は、生物学的な活動が異なることに起因していることとしている。すなわち、上記の事実は、AFMを用いて細胞を振動によって判別しようとした場合、高い精度で細胞の振動を計測できたとしても、細胞の特徴的な変動を示す部位を何らかの方法で予め知っておく必要があることを示唆する。しかし、非特許文献2にも記述されているように、AFMは探針を使うため、1つの細胞に複数の探針を配置することは物理的に難しい。そのため、1つのみの探針により細胞の特徴的な変動を示す部位を探し出すのは現実的でなく、結果的に、AFMを用いて細胞を判別することには難があるということとなる。また、細胞全体の走査のために分単位で時間がかかるという事実からも、AFMを用いて細胞判別をすることが困難であることが分かる。

30

【0007】

そこで、本発明は上記に鑑みてなされたもので、細胞を非侵襲且つ高精度で判別することが可能な細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0008】

上記課題を解決するために、本発明の細胞判別方法は、被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、前記細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成ステップと、前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して前記周波数解析を行った結果を、前記参照データ生成ステップにて生成された前記参照データと照らし合わせることにより、前記被検体の前記細胞を判別する細胞判別ステップと、を備えることを特徴とする。

【0009】

また、本発明の細胞判別用の参照データ生成方法は、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用

50

いて一定時間計測する振動計測ステップと、前記振動計測ステップにおける当該計測結果に対して周波数解析を行う周波数解析ステップと、前記周波数解析ステップにおける当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化ステップと、前記数値化ステップにおける当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成ステップと、前記散布図作成ステップにて作成された前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画ステップと、を備えることを特徴とする。

【0010】

また、本発明の細胞判別装置は、被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、前記細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成手段と、前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して前記周波数解析を行った結果を、前記参照データ生成手段が生成した前記参照データと照らし合わせることにより、前記被検体の前記細胞を判別する細胞判別手段と、を備えることを特徴とする。

10

【0011】

このような本発明の細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置によれば、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて計測する。定量位相顕微鏡を用いた計測方法によれば、光を使った非侵襲で、更にナノメートルスケールの高精度で、細胞の振動を計測することができる。また、AFMの場合と異なり、多点計測ができるため、細胞の特徴的な変動を示す部位を知らなくても、細胞全体としての特徴を捉えることができる。更に、計測時間面において、AFMの場合でのような長時間はかからないというメリットがある。そして、以上のような定量位相顕微鏡による計測方法を用いて、参照データを生成し、また当該参照データを用いて被検体の細胞を判別するため、結果的に、非侵襲、高精度、更に高速で細胞判別を行うことができる。

20

【0012】

また、本発明において、前記参照データ生成ステップは、前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する振動計測ステップと、前記振動計測ステップにおける当該計測結果に対して前記周波数解析を行う周波数解析ステップと、前記周波数解析ステップにおける当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化ステップと、前記数値化ステップにおける当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成ステップと、前記散布図作成ステップにて作成された前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画ステップと、を備え、前記参照データは、前記領域区画ステップにて当該領域区画された当該散布図であっても良い。

30

【0013】

また、本発明において、前記参照データ生成手段は、前記細胞の前記振動を前記定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する振動計測手段と、前記振動計測手段による当該計測結果に対して前記周波数解析を行う周波数解析手段と、前記周波数解析手段による当該周波数解析結果を近似することにより、前記振動の特性を数値化する数値化手段と、前記数値化手段による当該数値化の結果を元に散布図を作成する散布図作成手段と、前記散布図作成手段が作成した前記散布図における所定領域を前記細胞を判別するための判別領域として区画する領域区画手段と、を備え、前記参照データは、前記領域区画手段が当該領域区画した当該散布図であっても良い。

40

【0014】

この発明によれば、細胞判別を行う際に用いられる参照データを生成するための具体的な方法が提供される。

【0015】

また、本発明において、前記振動計測ステップでは、前記細胞に設けられた複数の計測領域に対してそれぞれ当該計測を行い、前記周波数解析ステップでは、それぞれの前記計測領域の当該計測結果に対して前記周波数解析を行い、且つ当該周波数解析結果を平均化

50

することにより前記細胞全体としての周波数解析結果を得ても良い。

【0016】

この発明によれば、細胞の振動計測および当該計測結果に対する周波数解析の具体的な方法が提供される。一つの細胞に対して多点計測を行った結果を平均化することにより、細胞全体としての周波数解析結果が得られる。このため、細胞の特徴的な変動を示す部位を知らなくても、細胞全体としての周波数解析結果を得ることができ、これをもって細胞判別を行うことができる。

【0017】

また、本発明において、前記周波数解析ステップでは、周波数およびパワースペクトルにより前記周波数解析が行われ、前記数値化ステップでは、前記周波数に対する前記パワースペクトルの値を近似化した近似線、および前記近似線における傾きを求め、前記散布図作成ステップでは、前記傾きを一の軸とし且つ所定の周波数における前記パワースペクトルの値を他の軸とする2次元上に、前記傾きに対して前記パワースペクトルの値を前記被検体の前記細胞ごとにプロットした図を、前記散布図として作成しても良い。

10

【0018】

この発明によれば、周波数解析、近似による数値化、および参照データ生成の具体的な方法が提供される。

【0019】

また、本発明において、前記散布図作成ステップでは、複数の前記所定の周波数に応じて複数の前記散布図が作成され、当該複数の前記散布図のうち、プロットされた前記パワースペクトルの値における決定係数の値が所定の値以下である前記散布図を、前記領域区画ステップにて当該領域区画される前記散布図として選択する散布図選択ステップを更に備えても良い。

20

【0020】

この発明によれば、複数の散布図のうち細胞判別に適した散布図を選択するための具体的な方法が提供される。

【0021】

また、本発明において、前記領域区画ステップにおける当該領域区画は、前記散布図上で区画線を設定することにより行われても良い。

【0022】

この発明によれば、散布図上に細胞判別を行うための判別領域を区画する具体的な方法が提供される。区画線を設定することにより、領域区画を容易に行うことができる。

30

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、細胞を非侵襲且つ高精度で判別することが可能な細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】細胞判別装置1の構成概要図である。

【図2】細胞判別装置1のハードウェア構成図である。

40

【図3】定量位相顕微鏡の構成図である。

【図4】撮像部251または受光部261に到達する光の強度と光路長差との関係を示す図である。

【図5】被測定物209の一構成例を示す図である。

【図6】定量位相顕微鏡における干渉像の撮像を説明するための図である。

【図7】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図8】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図9】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明する

50

ための図である。

【図 1 0】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図 1 1】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図 1 2】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図 1 3】定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例を説明するための図である。

【図 1 4】参照データ生成手順を示すフローチャートである。

10

【図 1 5】本実施形態における周波数解析および数値化を説明するための図である。

【図 1 6】図 1 5 のグラフから作成される散布図の一例を示す図である。

【図 1 7】第 1 実施形態における散布図の選択方法を説明するための図である。

【図 1 8】第 1 実施形態における散布図の選択方法を説明するための図である。

【図 1 9】細胞判別手順を示すフローチャートである。

【図 2 0】図 1 9 の細胞判別手順により細胞を判別した一例を示す図である。

【図 2 1】第 2 実施形態における散布図の選択方法を説明するための図である。

【図 2 2】第 2 実施形態における散布図の選択方法を説明するための図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

20

以下、添付図面を参照して本発明にかかる細胞判別方法、細胞判別用の参照データ生成方法、および細胞判別装置の好適な実施形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

【0026】

[第 1 実施形態]

(細胞判別装置 1 の構成)

まず、本発明の第 1 実施形態に係る細胞判別装置 1 の構成について説明する。図 1 は細胞判別装置 1 の構成概要図であり、図 2 は細胞判別装置 1 のハードウェア構成図である。

【0027】

図 2 に示すように、細胞判別装置 1 は、物理的には、CPU 11、ROM 12 及び RAM 13 等の主記憶装置、キーボード及びマウス等の入力デバイス 14、ディスプレイ等の出力デバイス 15、他の装置との間でデータの送受信を行うためのネットワークカード等の通信モジュール 16、ハードディスク等の補助記憶装置 17 などを含む通常のコンピュータシステムとして構成される。後述する細胞判別装置 1 の各機能は、CPU 11、ROM 12、RAM 13 等のハードウェア上に所定のコンピュータソフトウェアを読み込ませることにより、CPU 11 の制御の元で入力デバイス 14、出力デバイス 15、通信モジュール 16 を動作させると共に、主記憶装置 12、13 や補助記憶装置 17 におけるデータの読み出し及び書き込みを行うことで実現される。

30

【0028】

図 1 に示すように、細胞判別装置 1 は、機能的には、振動計測部 110 (特許請求の範囲における「振動計測手段」に対応)、周波数解析部 120 (特許請求の範囲における「周波数解析手段」に対応)、数値化部 130 (特許請求の範囲における「数値化手段」に対応)、散布図作成部 140 (特許請求の範囲における「散布図作成手段」に対応)、散布図選択部 150、領域区画部 160 (特許請求の範囲における「領域区画手段」に対応)、参照データ格納部 170、およびデータ照合部 180 を備えて構成される。

40

【0029】

細胞判別装置 1 は、被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成部 (特許請求の範囲における「参照データ生成手段」に対応) と、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して

50

周波数解析を行った結果を、参照データ生成部が生成した参照データと照らし合わせることにより、被検体の細胞を判別する細胞判別部（特許請求の範囲における「細胞判別手段」に対応）に大別される。参照データ生成部には、振動計測部 110、周波数解析部 120、数値化部 130、散布図作成部 140、散布図選択部 150、領域区画部 160、および参照データ格納部 170が含まれる。細胞判別部には、振動計測部 110、周波数解析部 120、数値化部 130、およびデータ照合部 180が含まれる。

【0030】

振動計測部 110 は、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測するものである。定量位相顕微鏡については、後述する。

【0031】

周波数解析部 120 は、振動計測部 110 による当該計測結果に対して周波数解析を行うものである。

【0032】

数値化部 130 は、周波数解析部 120 による当該周波数解析結果を近似することにより、振動の特性を数値化するものである。

【0033】

散布図作成部 140 は、数値化部 130 による当該数値化の結果を元に散布図を作成するものである。散布図作成部 140 は、複数の所定の周波数に応じて複数の散布図を作成する。

【0034】

散布図選択部 150 は、散布図作成部 140 が作成した当該複数の散布図のうち、プロットされたパワースペクトルの値における決定係数の値が所定の値以下である散布図を、領域区画部 160 により当該領域区画される散布図として選択するものである。

【0035】

領域区画部 160 は、散布図作成部 140 により作成され散布図選択部 150 により選択された散布図における所定領域を細胞を判別するための判別領域として区画するものである。「参照データ」とは、領域区画部 160 が当該領域区画した当該散布図をいう。

【0036】

参照データ格納部 170 は、参照データを格納するものである。

【0037】

データ照合部 180 は、被検体の細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、当該計測結果に対して周波数解析し、更に数値化した結果を、参照データ格納部 170 に格納されている参照データと照らし合わせることにより、被検体の細胞を判別するものである。

【0038】

（定量位相顕微鏡）

次に、図 1 に示した振動計測部 110 を構成し、細胞の振動を計測する際に用いられる定量位相顕微鏡について説明する。振動計測部 110 は定量位相顕微鏡そのものであっても良く、定量位相顕微鏡を備えた測定モジュールであっても良い。なお、定量位相顕微鏡に関する以下の説明は、下記の参考文献 1 および参考文献 2 を更に参考にすることで、より容易に理解できる。

< 参考文献 1 > 特開 2009 - 122033 号公報

< 参考文献 2 > Toyohiko Yamauchi, "Low-coherent quantitative phase microscope for nanometer-scale measurement of living cells morphology", Opt. Exp., 16, 12227, 2008

【0039】

図 3 は、定量位相顕微鏡の構成図である。この図に示される定量位相顕微鏡は、被測定物 209 の表面形状を測定するものであって、光源 211、212、レンズ 221 ~ 225、アパーチャ 231、光合波器 241、光分波器 242、ハーフミラー 243、撮像部 251、解析部 252、受光部 261、変位検出部 262、ピエゾアクチュエータ 271

10

20

30

40

50

、駆動部 272、ミラー 273、ステージ 281、駆動部 282 および制御部 290 を備える。

【0040】

光源 211 は、コヒーレント長が比較的短い光 1 を出力するものであり、例えば波長帯域 600 nm ~ 900 nm の広帯域光を出力することができるタングステンランプまたはハロゲンランプである。一方、光源 212 は、コヒーレント長が比較的長い光 2 を出力するものであり、例えば波長 $1.31 \mu\text{m}$ のレーザ光を出力する半導体レーザ光源である。光合波器 241 は、光源 211 から出力されてレンズ 221 およびアパーチャ 231 を経て到達した光 1 を反射させるとともに、光源 212 から出力されて到達した光 2 を透過させて、これらの光を合波してレンズ 222 へ出力する。

10

【0041】

ハーフミラー 243 は、光合波器 241 により合波されてレンズ 222 を経て到達した光 1, 2 を 2 分岐して第 1 分岐光および第 2 分岐光とし、第 1 分岐光をレンズ 223 へ出力し、第 2 分岐光をレンズ 224 へ出力する。また、ハーフミラー 243 は、第 1 分岐光がレンズ 223 を経てミラー 273 により反射されて生じる第 1 反射光を再びレンズ 223 を経て入力するとともに、第 2 分岐光がレンズ 224 を経て被測定物 209 により反射されて生じる第 2 反射光を再びレンズ 224 を経て入力して、これら第 1 反射光と第 2 反射光とを干渉させて当該干渉光をレンズ 225 へ出力する。すなわち、ハーフミラー 243 は、干渉光学系を構成する要素である。

20

【0042】

光分波器 242 は、ハーフミラー 243 から出力されてレンズ 225 を経た光を入力し、そのうち光 1 を反射させて撮像部 251 へ出力し、光 2 を透過させて受光部 261 へ出力する。レンズ 223 ~ 225 は、ハーフミラー 243 から出力されて光分波器 242 により分波された干渉光 1 を撮像部 251 の撮像面上に結像する結像光学系を構成する要素である。撮像部 251 は、その結像された干渉光 1 の干渉パターンを撮像するものであり、例えば CCD カメラである。受光部 261 は、ハーフミラー 243 から出力されて光分波器 242 により分波された光 2 の強度を検出するものであり、例えばフォトダイオードである。

【0043】

ここで、ハーフミラー 243 からミラー 273 により反射されて再びハーフミラー 243 に到るまでの光路長と、ハーフミラー 243 から被測定物 209 により反射されて再びハーフミラー 243 に到るまでの光路長との光路長差を L とする。前述したように、光源 212 から出力され受光部 261 に到達する光 2 のコヒーレント長は比較的長いので、図 4 (a) に示されるように、受光部 51 に到達する光 2 の強度は、比較的広い光路長差 L の範囲において周期的に変化する。これに対して、光源 211 から出力され撮像部 251 に到達する光 1 のコヒーレント長は比較的短いので、図 4 (b) に示されるように、撮像部 251 に到達する光 1 の強度は、比較的狭い光路長差 L の範囲において周期的に変化し、しかも、光路長差 L が値 0 に近いほど干渉の振幅が大きい。

30

【0044】

このことを利用して、解析部 252 は、光路長差が複数の目標値それぞれに設定されたときに撮像部 251 により撮像された光 1 の干渉パターン像を取得し、それらの複数の干渉パターン像に基づいて、像の各位置において干渉の振幅が最大となる光路長差を求め、これにより被測定物 209 の表面形状 (高さ分布) を求める。

40

【0045】

ここで、被測定物 209 は、好適には例えば図 5 に示されるように、略平坦な基板 291 の主面に薄膜 292 が形成され、その薄膜 292 の上に半透明な測定対象物 293 が置かれたものである。薄膜 292 は、光 2 を高い反射率で反射させることで、後述するフィードバック制御の際の基準面として好適に用いられる。また、測定対象物 293 は細胞であるのが好適である。

【0046】

50

また、被測定物 209 の表面形状が波長未満の微小な凹凸を持つ場合には、干渉の振幅が最大となる光路長差付近において、光 2 の中心波長を λ とおいて、 $\lambda/4$ ずつ 4 回光路長差をシフトさせると共に干渉パターン像を取得し、それら 4 つの干渉パターン像に基づいて、像の各位置において干渉波形の位相オフセット値を求めることにより、被測定物 209 の表面形状（高さ分布）を求めることも可能である。

【0047】

さらには、干渉の振幅が最大となる光路長差を求める方法と、干渉波形の位相オフセット値を求める方法の両方によって得られた高さ分布を総合することによって、広い高さ範囲の表面形状を、波長未満の精度で得ることもできる。

【0048】

また、変位検出部 262 は、受光部 261 により検出された光 2 の強度の変化から、光路長差の変化量を求める。すなわち、光源 212、受光部 261 および変位検出部 262 は、光路長差を検出する光路長差検出手段を構成する要素である。なお、ピエゾアクチュエータ 271 によりミラー 273 に微小振動を与えて、或る光路長差を中心にして変調を与えることで、より正確に光路長差を検出することができる。

【0049】

ピエゾアクチュエータ 271、駆動部 272、ステージ 281 および駆動部 282 は、光路長差を調整する光路長差調整手段を構成する要素である。ステージ 281 は、駆動部 282 により駆動され、ハーフミラー 243 と被測定物 209 との間の光学系の光軸に平行な方向に被測定物 209 を移動させる。このとき、レンズ 224 を移動させることなく、ハーフミラー 243 と被測定物 209 との間の光学系を維持したままとする。すなわち、ハーフミラー 243 から測った被測定物 209 側のフォーカス面までの距離を維持したままとする。ピエゾアクチュエータ 271 は、駆動部 272 により駆動され、ハーフミラー 243 とミラー 273 との間の光学系の光軸に平行な方向に、ミラー 273 を移動させる。このとき、レンズ 223 を移動させることなく、ハーフミラー 243 とミラー 273 との間の光学系を維持したままとする。ピエゾアクチュエータ 271（第 1 移動手段）の作動範囲は、ステージ 281（第 2 移動手段）の作動範囲より狭い。また、ピエゾアクチュエータ 271 の位置精度は、ステージ 281 の位置精度より高い。なお、ステージ 281 を移動させるための駆動部 282 としては、例えば長距離移動型のピエゾアクチュエータや、ステッピングモータによる回転機構を用いることが可能である。

【0050】

制御部 290 は、変位検出部 262 による光路長差検出結果に基づいて、光路長差が複数の目標値に順次になるように、駆動部 272、282 を介してピエゾアクチュエータ 271 およびステージ 281 による光路長差調整動作を制御する。特に、制御部 290 は、複数の目標値それぞれにおいて、ピエゾアクチュエータ 271 による移動量が作動範囲内の所定範囲内となるように、ステージ 281 による移動動作を連続的または断続的に行わせる。また、制御部 290 は、ステージ 281 による移動動作の際にも、変位検出部 262 による光路長差検出結果に基づいて、光路長差が各目標値になるようにピエゾアクチュエータ 271 による移動動作をフィードバック制御する。

【0051】

以上で説明した定量位相顕微鏡は、二光束干渉顕微鏡において、細胞膜からの反射光の位相計測を行う装置であり、細胞の厚みよりも十分に短い（例えば細胞の厚みの $1/3$ 未満）コヒーレンス長の光源を有し、焦点深度が $1\ \mu\text{m}$ 未満の対物レンズを備え、二光束の分岐点から測った被測定細胞の細胞膜表面までの光路長と、同分岐点から測った参照鏡までの光路長との差をコヒーレンス長未満に制御し、且つサンプル側対物レンズの焦点位置を当細胞膜表面に合わせこんだ状態で、一定時間連続して（例えば 1 秒間隔で 3 分間など）干渉画像を得る。

【0052】

具体的には、図 6 に示すように、波長フィルタリングしたハロゲンランプ（中心波長 $850\ \text{nm}$ ）を用いて対物レンズを通して目的の細胞に照明光を照射し、フィードバック制

10

20

30

40

50

御しながら細胞膜表面にフォーカスを合わせると同時に、物体光と参照光の光路長を合わせることにより、細胞膜からの反射光の干渉像を撮像する。干渉像の撮像には、参照光の光路長を光源波長の1/4ずつ変化させながら、7枚で1組の画像、すなわち I_1 、 I_2 、 I_3 、 I_4 、 I_5 、 I_6 、 I_7 を取得する。これら7枚1組の画像から、

$$A = I_1 - 3 * I_3 + 3 * I_5 - I_7 \dots (1)$$

$$B = -2 * I_2 + 4 * I_4 - 2 * I_6 \dots (2)$$

を求め、更には、

$$= \tan^{-1} (A / B) \dots (3)$$

を求める(位相抽出)。

【0053】

(定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例)

次に、以上で説明した定量位相顕微鏡を用いて細胞の振動に対する時間変動を計測した一例について、図7～図13を参照しながら説明する。細胞膜にフォーカスを合わせて得られた位相画像(図7)では、なだらかに連続する細胞膜の形状を反映して、細胞膜の高さに応じて干渉縞が空間的に連続して表示される。一方、細胞膜が、定量位相顕微鏡の測定領域に存在していない領域は連続した位相が得られず、干渉縞は見られない。干渉縞が空間的に連続する領域と位相がランダムになる領域との境界を検出することは容易であり、境界に対して位相が空間的に連続する側の領域を細胞膜の存在領域として特定する(図8において白線で囲まれた領域)。

【0054】

その上で、時間的に連続する位相画像の各画素において、時間的に位相アンラッピングを行い、すべての隣接する撮像フレーム同士の間で、ある閾値maxを超えるような不連続な位相の変化のない画素を細胞膜の時間変動情報が得られた画素と判定する。本実施例では、maxを $\pi/2$ とし、 $\pi/2$ を超えるような不連続な位相の変化のない画素を細胞膜の時間変動情報が得られた画素と判定した(図9における白色画素)。すなわち、空間位相から特定した細胞膜領域内に存在する画素(図8において白線で囲まれた領域の画素)、および時間位相アンラッピングにて連続する位相が得られた画素(図9における白色画素)の共通部分を、細胞膜からの時間変動情報が記録できた画素として特定する(図10における白線内の白色画素)。

【0055】

次に、それぞれの個々の細胞における細胞膜の変位を数値化する段階に進む。細胞膜の振動は細胞膜上で波のようにダイナミックに変化しているため、振動の周波数に共通性はあるとしても計測する空間的な場所に応じて振動の位相が異なる。そのため、一つの細胞に対して細胞全体を含むようにすべての画素の平均値の変位を求めても、細胞膜の振動は打ち消されて細胞膜の挙動を十分に反映することはできない。そこで、一つの細胞につき5～7箇所の複数の計測領域を設ける。

【0056】

図11は各々の細胞に設けた複数の計測領域を示しており、計測領域が四角のマークで表示されている。設定した複数の計測領域において、領域を構成する画素の平均値について時間変化を求める。細胞膜の変位の時間変化は測定開始後からの変化量として評価してよい。

【0057】

このようにして、一つの細胞に対して細胞膜の領域を複数領域に細分し、複数の領域の細胞膜の時間変位を求めると、図12および図13に示すような、各計測領域における時間と変位のグラフを描くことができる。図12および図13では2つの種類の異なる細胞の細胞膜の時間変位を示しており、細胞の種類によって細胞膜の時間的な挙動が異なることを示唆するものである。図12は未分化な幹細胞の時間変位を示しており、図13は分化した破骨細胞の時間変位を示している。

【0058】

なお、細胞の膜の変位を計測する際には温度により細胞膜の変動の大きさが変化するの

10

20

30

40

50

で、一定の温度管理下で計測することが望ましい。

【 0 0 5 9 】

(細胞判別装置 1 により行われる動作)

続いて、細胞判別装置 1 により行われる動作(特許請求の範囲における「細胞判別用の参照データ生成方法」および「細胞判別方法」に対応)の一例として、被検体の細胞の種類を判別する方法について説明する。被検体の細胞の種類を判別する手順は、被検体である細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し、且つ当該計測結果に対して周波数解析を行うことにより、細胞を判別するための参照データを生成する参照データ生成手順(特許請求の範囲における「参照データ生成ステップ」に対応)と、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測し且つ当該計測結果に対して周波数解析を行った結果を、参照データ生成手順にて生成された参照データと照らし合わせることにより、被検体の細胞を判別する細胞判別手順(特許請求の範囲における「細胞判別ステップ」に対応)に大別される。以下、各手順の詳細について説明する。

10

【 0 0 6 0 】

(参照データ生成手順)

図 1 4 は、参照データ生成手順を示すフローチャートである。参照データ生成手順では、予め細胞の種類が判別されている細胞集団を用意し、当該細胞集団の細胞を計測した結果から参照データを作成する。

【 0 0 6 1 】

図 1 4 に示すように、最初に、レファランス(参照)となる細胞集団を 2 種類以上用意する(ステップ S 1 0 1)。

20

【 0 0 6 2 】

次に、ステップ S 1 0 1 にて用意した複数の細胞集団における細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する。具体的には、それぞれの細胞について複数の計測領域を設定し、当該複数の計測領域のそれぞれに対して振動計測を行い、細胞の振動の時間変位量を得る(ステップ S 1 0 2、特許請求の範囲における「振動計測ステップ」に対応)。

【 0 0 6 3 】

次に、ステップ S 1 0 2 で得た複数の計測領域のそれぞれにおける細胞振動の時間変位量(計測結果)に対して、周波数およびパワースペクトルによる周波数解析を行う(ステップ S 1 0 3、特許請求の範囲における「周波数解析ステップ」に対応)。周波数解析の指標であるパワースペクトル(PSD)は、以下の数式(4)および(5)で計算される。

30

【数 1】

$$FFT(n) = \frac{1}{N} \sum_{m=0}^{N-1} \Delta h(m) \cdot \exp\left(-j \cdot 2\pi \frac{m \cdot n}{N}\right) \quad \cdots (4)$$

【数 2】

$$PSD(n) = 2N \cdot \Delta t \cdot |FFT(n)|^2 \quad \cdots (5)$$

40

上記の数式(4)および(5)において、Nは時間軸上でのサンプリング点数である。

tはサンプリングの時間間隔である。h(m)は、t = t * mの時点での計測開始時からの細胞膜の変位量である。なお、m = 0、1、2、3、...(N - 1)である。

【 0 0 6 4 】

次に、ステップ S 1 0 3 で求めたパワースペクトルを平均化することにより細胞全体としての周波数解析結果を得る(ステップ S 1 0 4)。つまり、一つの細胞における周波数

50

パワースペクトルを得るには、一つの細胞に複数の計測領域を設けて得られたそれぞれの計測領域の細胞膜の時間変位データからそれぞれ周波数解析を行いパワースペクトルデータを取得し、複数の計測領域のパワースペクトルを平均化して、一つの細胞の全体としての周波数パワースペクトルを得る。

【0065】

次に、ステップS103およびステップS104における当該周波数解析結果を近似することにより、細胞の振動の特性を数値化する。この手順では、周波数に対するパワースペクトルの値を近似化した近似線、および当該近似線における傾きを求める（ステップS105、特許請求の範囲における「数値化ステップ」に対応）。

【0066】

具体的には、離散化された周波数を横軸に、且つパワースペクトルを縦軸に取って、ステップS103およびステップS104における当該周波数解析結果を両対数でプロットすると、図15に示すようなパワースペクトルのグラフが得られる。図15には特性の異なる4種類のパワースペクトル(A~D)の例を模式的に示した。グラフAは、振幅が大きく、パワースペクトルが周波数の-1乗に比例するような特性、グラフBは、振幅が大きく、パワースペクトルが周波数によらず一定であるような特性、グラフCは、振幅が小さく、パワースペクトルが周波数の-1乗に比例するような特性、グラフDは、振幅が小さく、パワースペクトルが周波数によらず一定であるような特性である。

【0067】

この細胞膜の振動のパワースペクトルを、両対数グラフ上において直線で近似することで、つまり図15のグラフA~Dを直線で近似することで、振動の特性を数値化することができる。なお、両対数グラフ上での直線は、パラメータAとsを用いて、式(6)によって表される。Aは図15において $f = 1 \text{ Hz}$ における近似直線の値であり、sは両対数グラフ上に引いた直線の傾き（つまりグラフA~Dの傾き）である。

$$P S D_{f_{i t}}(f) = A * f^s \dots (6)$$

【0068】

次に、ステップS105における当該数値化の結果を元に散布図を作成する。この手順では、傾きを一の軸とし且つ所定の周波数におけるパワースペクトルの値を他の軸とする2次元上に、傾きに対してパワースペクトルの値を被検体の細胞ごとにプロットした図を、散布図として作成する（ステップS106、特許請求の範囲における「散布図作成ステップ」に対応）。

【0069】

具体的に、細胞集団の中のそれぞれの細胞について、細胞膜の振動計測を行い、パワースペクトルを集計するにあたって、得られたパワースペクトルの近似直線の傾きsを横軸に、ある周波数 $f = f_0$ におけるパワースペクトルの近似直線の値($P S D_{f_{i t}}(f_0)$)を縦軸に取ってプロットすると、視覚的に分かりやすく、また統計的にも処理しやすい散布図を得ることができる。例えば、所定の周波数として $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ を用いて、図15の4つのパワースペクトルを散布図にプロットすると、図16のような散布図が得られる。

【0070】

次に、ステップS106にて作成された散布図における所定領域を細胞を判別するための判別領域として区画する（ステップS108、特許請求の範囲における「領域区画ステップ」に対応）。この手順における当該領域区画は、散布図上で区画線を設定することにより行われる。そして、この手順にて当該領域区画された当該散布図を、細胞を判別するための判断基準となる参照データとして参照データ格納部170に格納する（ステップS109）。以下、散布図作成や領域区画について、より詳しく説明する。

【0071】

散布図を作成するにあたっては、上述したステップS106にて複数の所定の周波数に対して散布図が作成され、当該複数の散布図のうち、プロットされたパワースペクトルの値における決定係数の値が所定の値以下である散布図を、ステップS108にて当該領域

10

20

30

40

50

区画される散布図として選択する手順を更に含む（ステップS107、特許請求の範囲における「散布図選択ステップ」に対応）。

【0072】

図17に、異なる f_0 を用いて作成した、細胞膜のパワースペクトルの近似直線の散布図を示す。元となるデータは生細胞を用いた実験によって得られたものである。元データは、ヒト乳癌細胞由来の細胞株MCF7（細胞数 $N=11$ ）のものと、マウス膵臓由来の細胞株INS1（細胞数 $N=10$ ）のものからなる。図17(a)は、 $f_0=0.02\text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。図17(b)は、 $f_0=0.1\text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。図17(c)は、 $f_0=1\text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。それぞれのグラフにおいて、横軸はパワースペクトルの近似直線の傾きであり、縦軸は近似直線の $f=f_0$ におけるパワースペクトル値の常用対数（ $\log_{10}(\text{PSD}_{\text{fit}}(f_0))$ ）である。図17においては細胞の種類を区別せずに、被測定細胞すべてを対象にしてプロットした。

10

【0073】

図17のそれぞれについて、最小二乗法により一次関数による近似直線を引いて、決定係数 R^2 を求めた。 $f_0=0.02\text{ Hz}$ を用いた場合は決定係数 $R^2=0.8537$ 、 $f_0=0.1\text{ Hz}$ を用いた場合は決定係数 $R^2=0.5779$ 、 $f_0=1\text{ Hz}$ を用いた場合は決定係数 $R^2=0.2726$ となった。図からも視覚的に明らかのように、 $f_0=0.02\text{ Hz}$ を用いた場合（図17(a)）では横軸と縦軸の相関が大きく（ $R^2>0.6$ ）、二変数でプロットしている意義が失われてしまっている。したがって、 $f_0=0.02\text{ Hz}$ を用いるのは適切ではないと判断する。

20

【0074】

次に、細胞集団ごとの違いを定量化するため、被測定細胞に含まれるMCF7とINS1を区別してプロットしたのが図18である。決定係数 R^2 が大きい $f_0=0.02\text{ Hz}$ を用いた場合のグラフは除外した。 $f_0=0.1\text{ Hz}$ を用いた場合（図18(a)）と、 $f_0=1\text{ Hz}$ を用いた場合（図18(b)）を比べると、図18(a)の場合には垂直線と水平線を用いた単純な区画線でINS1の細胞集団とMCF7の細胞集団を区別することができる。この細胞弁別を、細胞集団からMCF7のみを区別する試験と考えた場合、図18(a)の場合は図に示した太線の区画線を用いて、感度91%、特異度100%で弁別ができるのに対し、図18(b)の場合は感度72%、特異度90%となり、明らかに弁別の性能が劣る。

30

【0075】

したがって、これらの結果から、上記示した実施例において、散布図の縦軸 $\text{PSD}_{\text{fit}}(f_0)$ に用いる f_0 としては、 $f_0=0.1\text{ Hz}$ が適切であることが分かる。 $f_0=0.1\text{ Hz}$ を用いた散布図（図18(a)）を用いることで、細胞一個一個の違いが2変数を用いて分布的に示され、細胞集団同士の弁別も容易になる。このようにして特定の2種類の細胞集団の細胞弁別を行う判断基準が設定できる。これをリファレンスデータ（参照データ）とする。リファレンスデータは種類や状態の異なる2種類以上の細胞集団について取得し、格納しておく。

40

【0076】

（細胞判別手順）

引き続き、細胞判別手順について説明する。細胞判別手順は、被検体となる未知の細胞の細胞膜の振動を一定時間計測し、細胞膜の振動の周波数解析を行い、既に格納されているリファレンスデータの2成分散布図に当てはめることによって行う。弁別したい被検体の細胞は、リファレンスデータとして既に取得済みである種類と同種類の細胞である。以下、図19を参照しながら細胞判別手順の詳細について説明する。図19は、細胞判別手順を示すフローチャートである。

【0077】

図19に示すように、最初に、被検体となる未知の細胞を用意する（ステップS201

50

）。

【 0 0 7 8 】

次に、ステップ S 2 0 1 にて用意した被検体の細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて一定時間計測する。具体的には、被検体細胞について複数の計測領域を設定し、当該複数の計測領域のそれぞれに対して振動計測を行い、細胞の振動の時間変位量を得る（ステップ S 2 0 2 ）。

【 0 0 7 9 】

次に、ステップ S 2 0 2 で得た複数の計測領域のそれぞれにおける細胞振動の時間変位量（計測結果）に対して、周波数およびパワースペクトルによる周波数解析を行う（ステップ S 2 0 3、ステップ S 2 0 4）。周波数解析の手法は上述のステップ S 1 0 3 およびステップ S 1 0 4 と同様であるため、ここでは説明を省略する。

【 0 0 8 0 】

次に、ステップ S 2 0 3 およびステップ S 2 0 4 における当該周波数解析結果を近似することにより、細胞の振動の特性を数値化する（ステップ S 2 0 5）。数値化の手法は上述のステップ S 1 0 5 と同様であるため、ここでは説明を省略する。

【 0 0 8 1 】

次に、ステップ S 2 0 5 における当該数値化の結果を、参照データ生成手順で作成した参照データに当てはめる。図 2 0 に示すように、参照データには 2 種類の細胞（M C F 7 と I N S 1）を識別するための区画線 M が引かれており、判別領域 L が M C F 7 を判別するための判別領域である。図 2 0 のような参照データを用いて、被検体となる未知の細胞の振動の特性を数値化したものが判別領域 L 内に位置するのであれば、当該未知の細胞は M C F 7 であると判別することができる（ステップ S 2 0 6）。

【 0 0 8 2 】

（参照データ生成手順および細胞判別手順のまとめ）

以上、参照データ生成手順および細胞判別手順を説明した。以上の説明を簡単にまとめると次のようである。（ 1 ）細胞一個一個の細胞膜の変動の周波数パワースペクトルを計算し、それぞれを式（ 6 ）に基づきフィッティングし、フィッティング直線の傾き s とフィッティング直線の複数の $f = f_0$ におけるパワースペクトルの値を求め、各細胞の細胞膜振動の周波数パラメータとする。（ 2 ）リファレンスとなる 2 種類以上の細胞集団についてフィッティング直線の傾き s を横軸、フィッティング直線の $f = f_0$ における値を縦軸にして、各細胞のパワースペクトルの特性を 2 変数の散布図にプロットする。（ 3 ）異なる f_0 を用いて複数の 2 変数散布図を作成する。（ 4 ）2 変数散布図の中で、プロットされた点の決定係数の大きいものを除外し、決定係数の値が所定の値以下のものを選択する。上記の例においては決定係数が例えば 0.6 以下のものを選択した。（ 5 ）2 変数散布図を、細胞集団ごとに別のシンボルや色を用いてプロットし、細胞集団同士の弁別が単純な区画線を用いて可能となるような f_0 を採用し、2 変数散布図と区画線を決定し、2 種類の細胞集団を弁別するためのリファレンスデータとする。（ 6 ）被検体である未知細胞について細胞膜の変動を計測し、得られた周波数パラメータをリファレンスデータの 2 変数散布図と区画線に当てはめて細胞を弁別する。このような手続きを経ることで、細胞膜の変動の周波数解析をもとにして細胞を弁別する方法および装置を提供することができる。

【 0 0 8 3 】

[第 2 実施形態]

引き続き、本発明の第 2 実施形態について説明する。第 2 実施形態では、複数作成した散布図の選択方法が、第 1 実施形態と主に相違している。つまり、第 1 実施形態における図 1 4 のステップ S 1 0 7 において相違点がある。以下ではこの相違点を中心に説明する。

【 0 0 8 4 】

第 1 実施形態で既に説明したステップ S 1 0 1 ~ ステップ S 1 0 6 を経て、異なる f_0 を複数用いて複数作成した、細胞膜のパワースペクトルの近似直線の散布図を図 2 1 に示

す。元となるデータは生細胞を用いた実験によって得られたものである。元データは、ヒト乳癌細胞由来の細胞株 MCF7 (細胞数 $N = 11$) のものと、マウス膵臓由来の細胞株 INS1 (細胞数 $N = 10$) のものからなり、細胞の種類が区別できるようにプロットしたものである。それぞれのグラフにおいて、横軸はパワースペクトルの近似直線の傾き、縦軸は近似直線の $f = f_0$ における値の常用対数 ($\log_{10}(\text{PSD}_{f_{it}}(f_0))$) である。図 21 (a) は、 $f_0 = 0.02 \text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。図 21 (b) は、 $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。図 21 (c) は、 $f_0 = 1 \text{ Hz}$ を用いて、細胞集団のパワースペクトルの特性をプロットしたものである。

【0085】

図 21 において、INS1 の細胞集団と MCF7 の細胞集団をもっとも良く区別するために直線と水平線を用いた単純な区画線を引くことを行う。この細胞弁別を、細胞集団から MCF7 のみを区別する試験と考えた場合、図 21 (a) の場合は図に示した太線の区画線を用いて、感度 100%、特異度 85%、図 21 (b) の場合は感度 91%、特異度 100% で弁別できるのに対し、図 21 (c) の場合は感度 72%、特異度 90% となり明らかに弁別の性能が劣る。そこで、この中で、 $f_0 = 0.02 \text{ Hz}$ を用いた場合 (図 21 (a)) と $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ を用いた場合 (図 21 (b)) を弁別能力の高い候補として残し、 $f_0 = 1 \text{ Hz}$ を用いた場合 (図 21 (c)) を候補から除く。

【0086】

次に、絞られた候補に対し、すべての細胞のプロットに対して、最小二乗法により一次関数による近似直線を引いて、決定係数 R^2 を求めた (図 22)。ここでは、細胞の種類を区別せずに、被測定細胞すべてを対象にしてプロットした。 $f_0 = 0.02 \text{ Hz}$ を用いた場合は決定係数 $R^2 = 0.8537$ 、 $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ を用いた場合は決定係数 $R^2 = 0.5779$ となった。図からも視覚的に明らかのように、 $f_0 = 0.02 \text{ Hz}$ を用いた場合 (図 22 (a)) では横軸と縦軸の相関が大きく ($R^2 > 0.6$)、二変数でプロットしている意義が失われてしまっている。したがって、 $f_0 = 0.02 \text{ Hz}$ を用いるのは適切ではないと判断する。

【0087】

したがって、これらの結果から、上記示した実施例において、散布図の縦軸 $\text{PSD}_{f_{it}}(f_0)$ に用いる f_0 としては、 $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ が適切であることが分かる。 $f_0 = 0.1 \text{ Hz}$ を用いた散布図 (図 22 (b)) を用いることで、細胞一個一個の違いが二変数を用いて分布的に示され、細胞集団同士の弁別も容易になる。このようにして特定の二種類の細胞集団の細胞弁別を行う判断基準が設定できる。これをリファレンスデータ (参照データ) とする。リファレンスデータは種類や状態の異なる二種類以上の細胞集団について取得し、格納しておく。

【0088】

(本実施形態の作用・効果、そして応用)

本実施形態によれば、細胞の振動を定量位相顕微鏡を用いて計測する。定量位相顕微鏡を用いた計測方法によれば、光を使った非侵襲で、更にナノメートルスケールの高精度で、細胞の振動を計測することができる。また、AFM の場合と異なり、多点計測ができるため、細胞の特徴的な変動を示す部位を知らなくても、細胞全体としての特徴を捉えることができる。更に、計測時間面において、AFM の場合でのような長時間はかからないというメリットがある。そして、以上のような定量位相顕微鏡による計測方法を用いて、参照データを生成し、また当該参照データを用いて被検体の細胞を判別するため、結果的に、非侵襲、高精度、更に高速で細胞判別を行うことができる。

【0089】

従来、培養した細胞の状態を把握したり、分化/未分化やがん化などの細胞の変化を判断する手段としては、観測者が光学顕微鏡を用いて細胞の形態を肉眼で観察し、経験的な判断に委ねられることが多く、再現性や品質の安定性のうえでは十分とは言いがたかった。また、定量的に判断する手段として、蛍光試薬や蛍光で標識された細胞特異的な抗体等

10

20

30

40

50

で処理して判断する方法が用いられているが、標識した細胞の培養を継続することは事実上困難であるので、判定した細胞を引き続き培養するなど、生きたまま再利用することができなかった。

【0090】

本実施形態では生きた細胞のまま細胞膜の状態を測定することによって細胞を非侵襲に評価、識別することができるため、蛍光ラベルができない用途に広く利用できると考えられる。具体的には培養している細胞の状態をモニタリングする装置が考えられる。細胞の状態モニタリング装置は細胞選別装置の前処理として、目的の細胞を非侵襲に識別してその座標を記憶する装置としても役立つ。また細胞の状態モニタリング装置は細胞を用いた創薬スクリーニングにおける試験の前処理として、試験に用いる培養した細胞の状態を把握して測定結果に重みづけをする装置としても役に立つ。応用面では、ES細胞、iPS細胞を含む幹細胞からの分化誘導における分化/未分化状態の識別、正常細胞とがん細胞の識別、異なる細胞集団が混在する環境における細胞の種類の識別、凍結解凍直後における細胞蘇生率の迅速判定などに利用することができる。

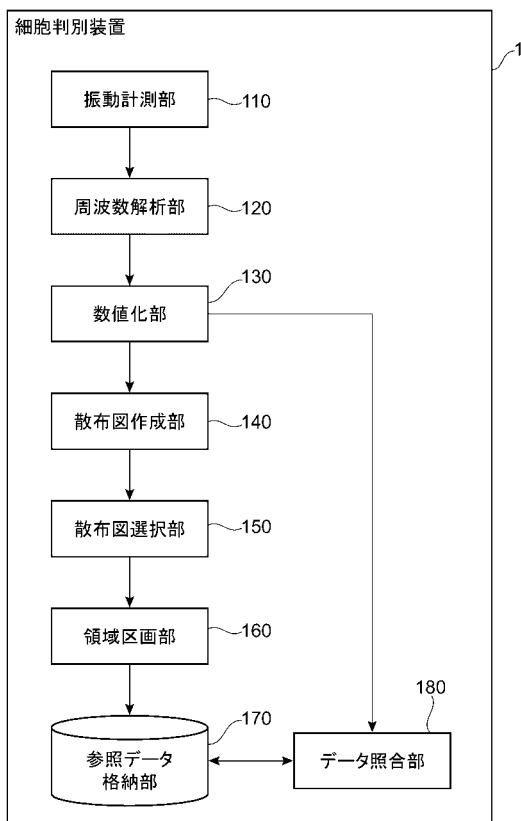
10

【符号の説明】

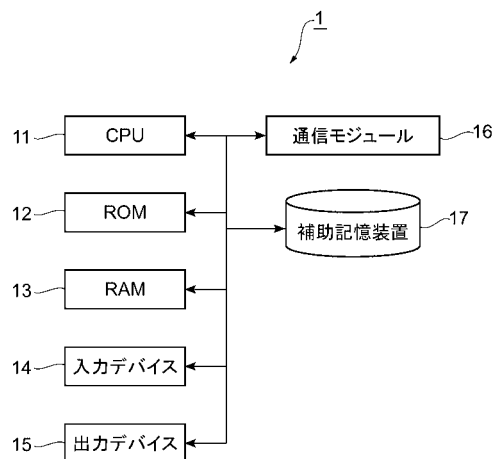
【0091】

1 ... 細胞判別装置、110 ... 振動計測部、120 ... 周波数解析部、130 ... 数値化部、140 ... 散布図作成部、150 ... 散布図選択部、160 ... 領域区画部、170 ... 参照データ格納部、180 ... データ照合部。

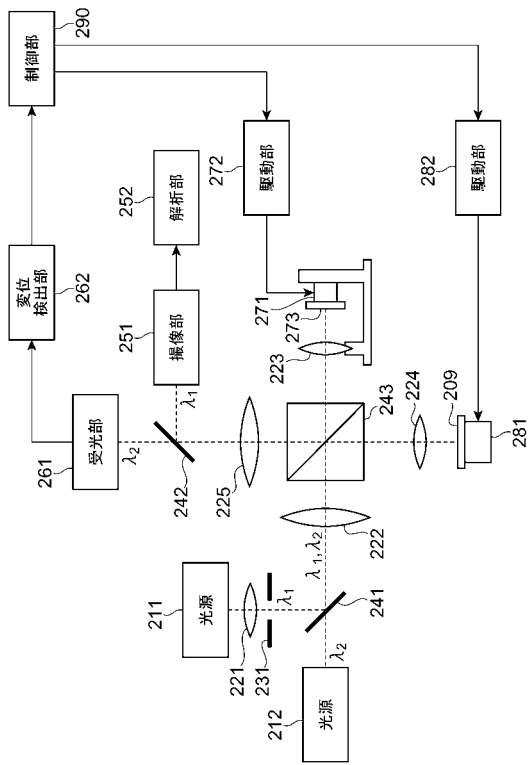
【図1】



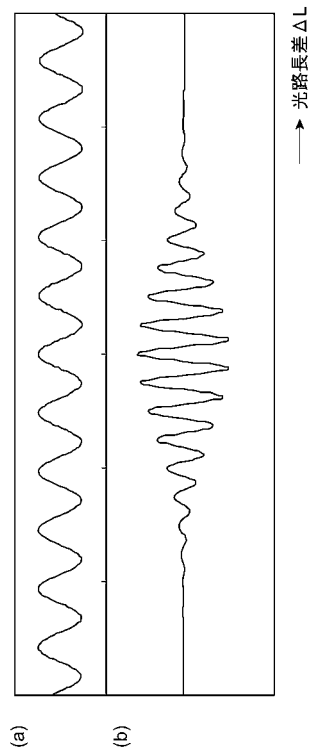
【図2】



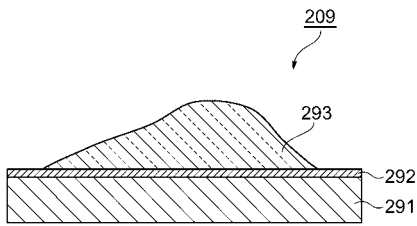
【 図 3 】



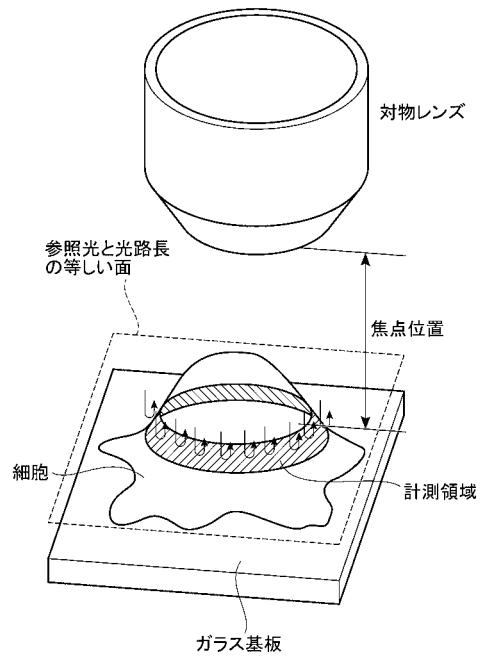
【 図 4 】



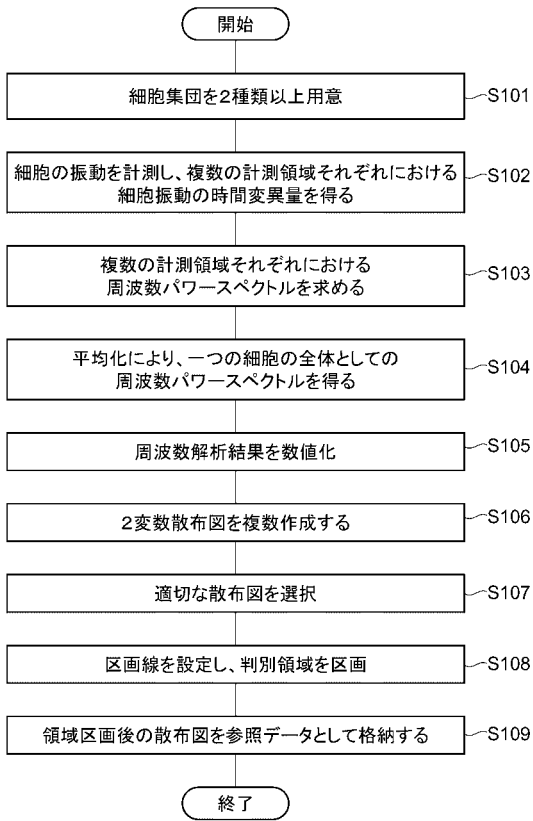
【 図 5 】



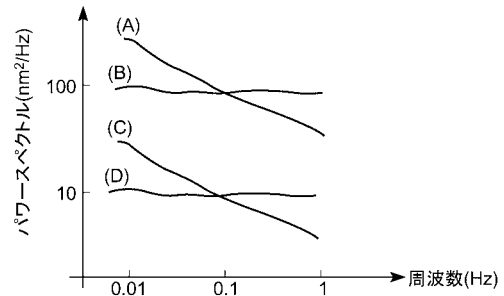
【 図 6 】



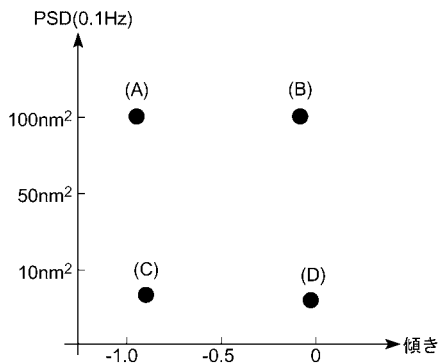
【 図 1 4 】



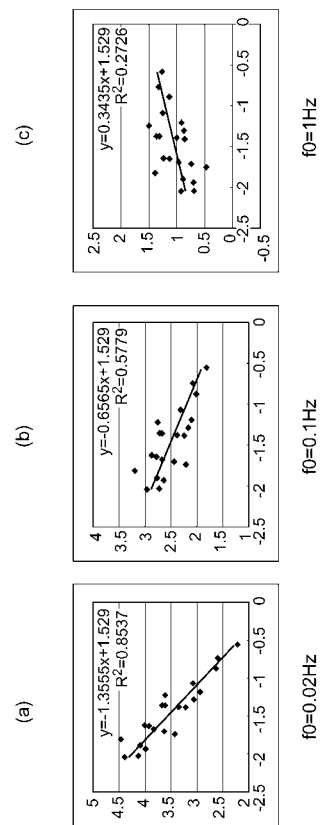
【 図 1 5 】



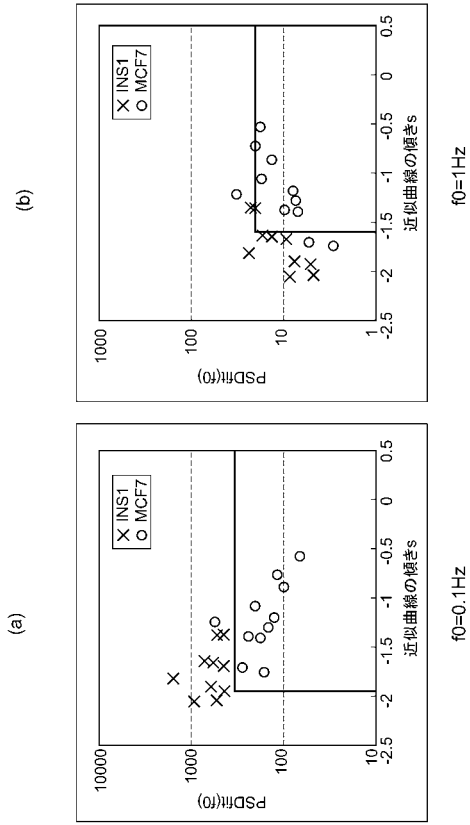
【 図 1 6 】



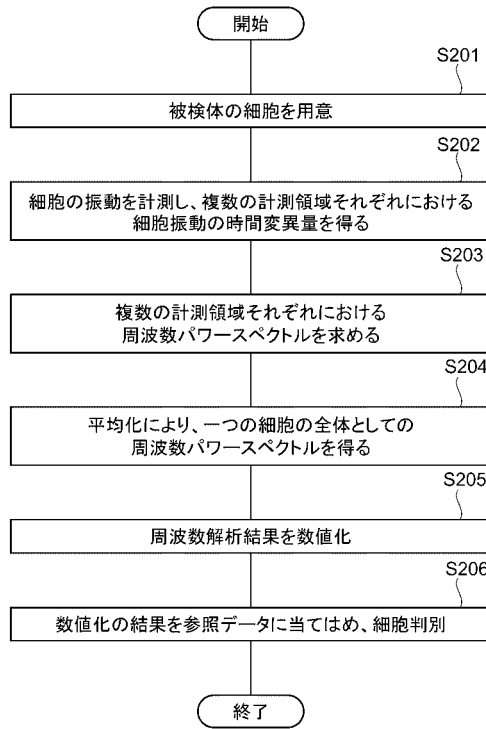
【 図 1 7 】



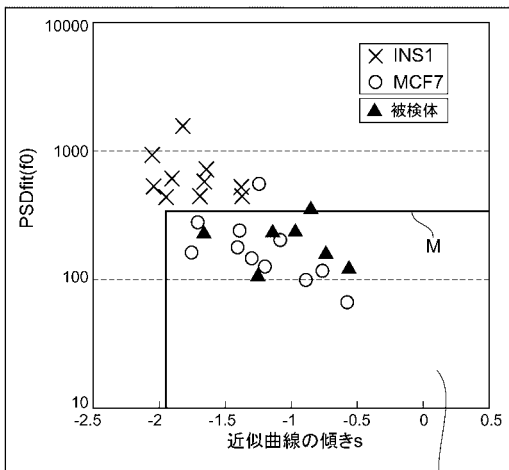
【 図 1 8 】



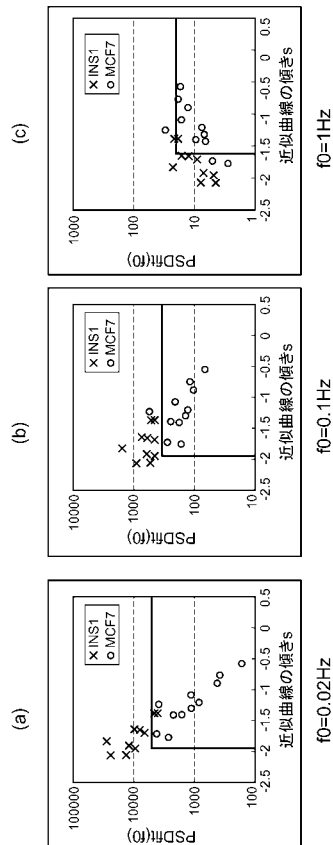
【 図 1 9 】



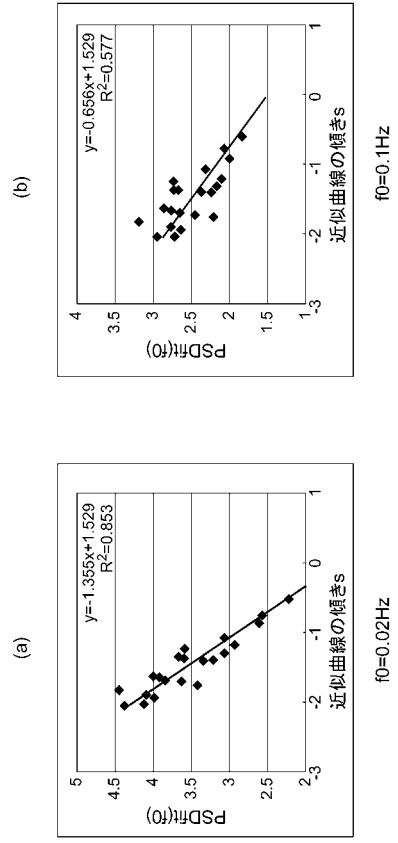
【 図 2 0 】



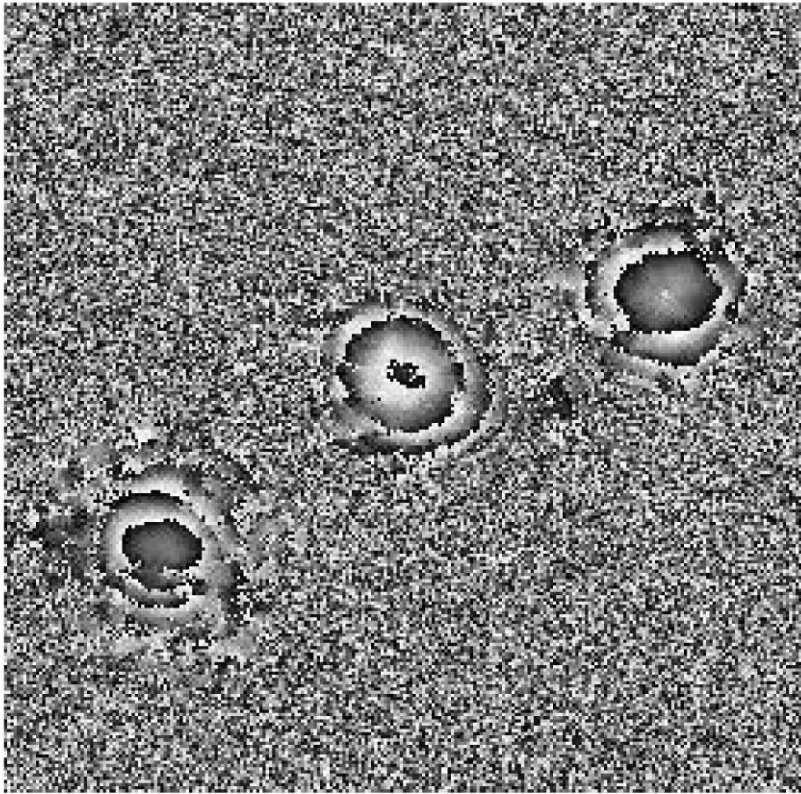
【 図 2 1 】



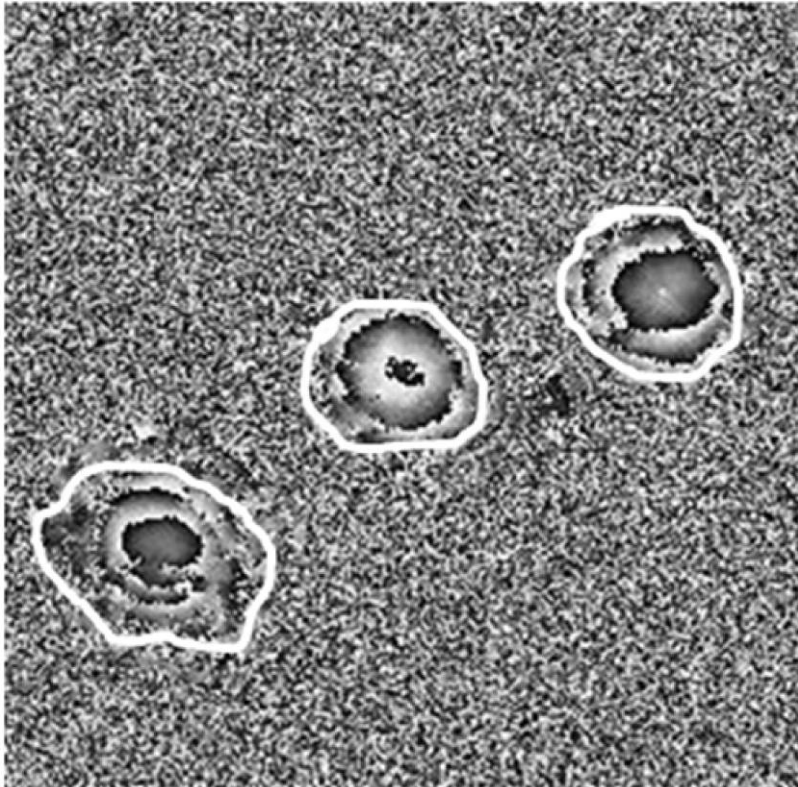
【 図 2 2 】



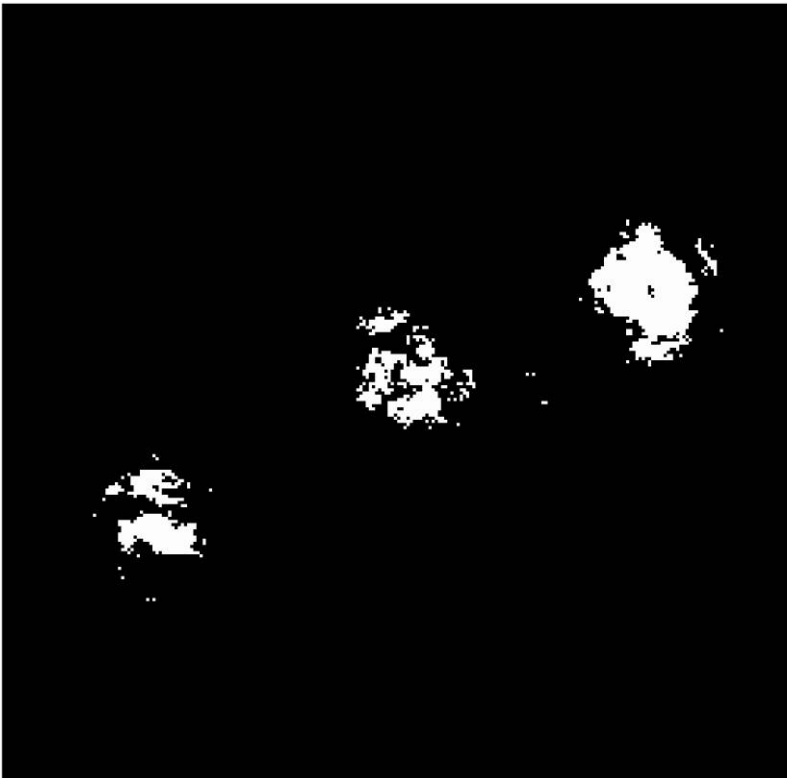
【 図 7 】



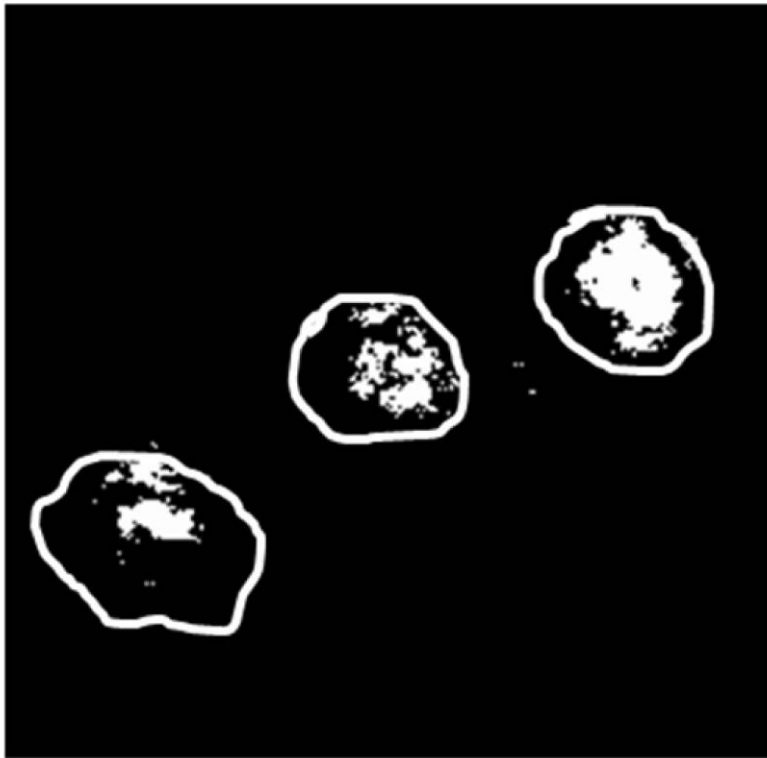
【 図 8 】



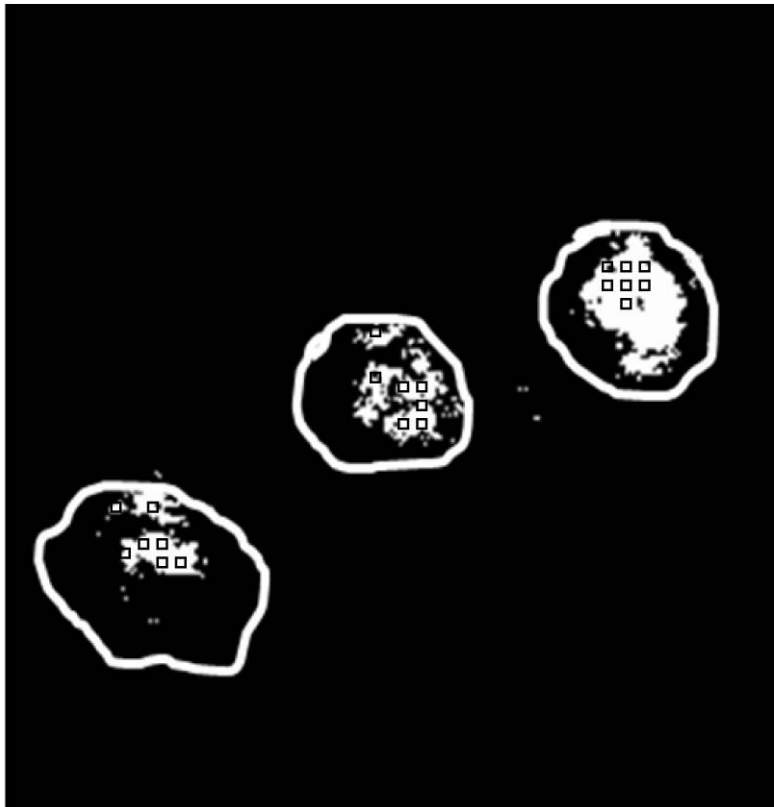
【 図 9 】



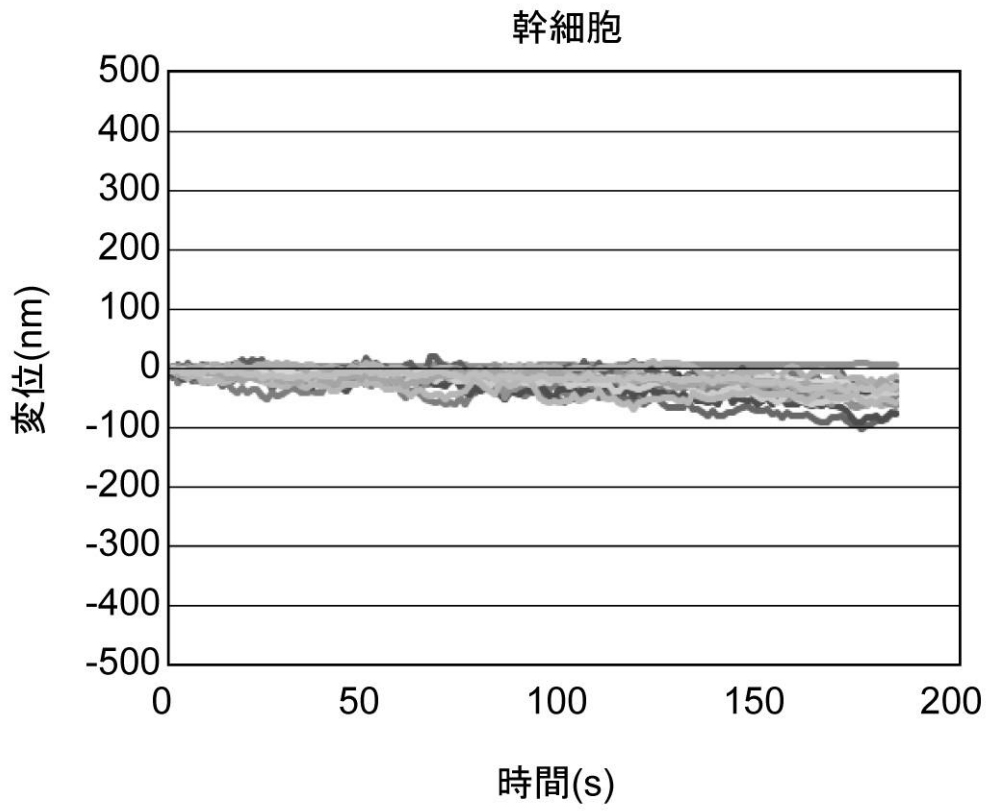
【 図 1 0 】



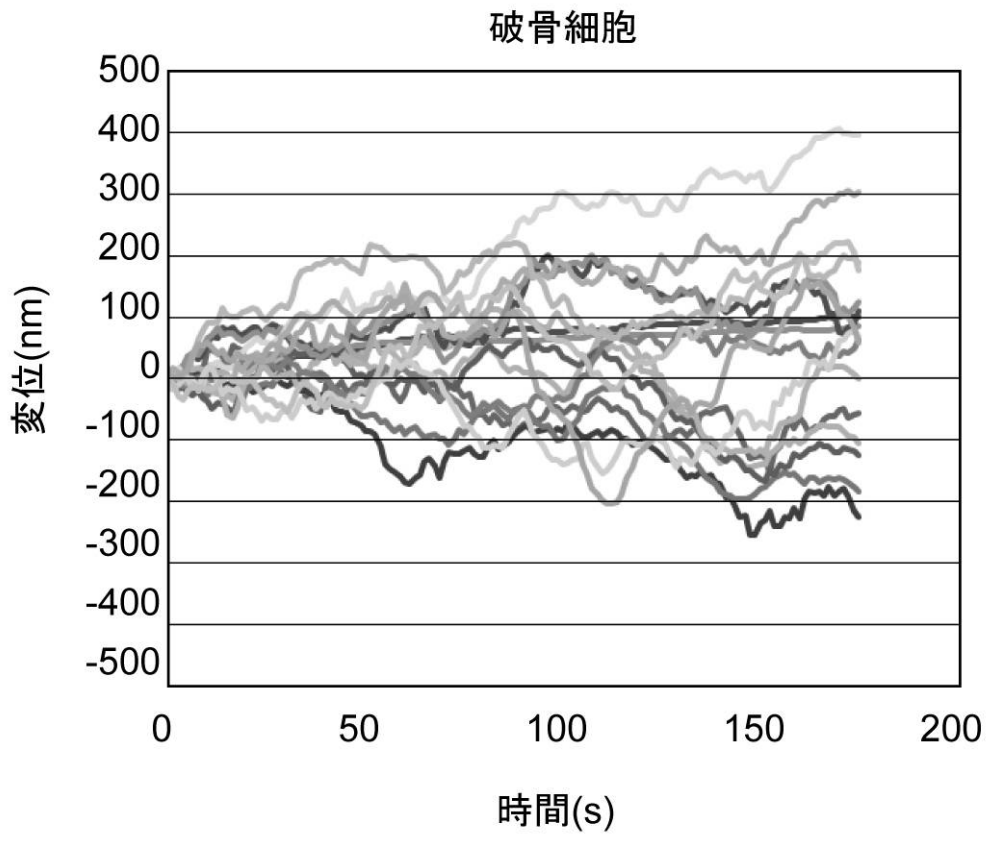
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 櫻井 孝司
静岡県浜松市東区半田山1丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内
- (72)発明者 杉山 範和
静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内
- (72)発明者 山内 豊彦
静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内
- (72)発明者 岩井 秀直
静岡県浜松市東区市野町1126番地の1 浜松ホトニクス株式会社内
- Fターム(参考) 4B029 AA07 BB01 CC02 FA01
4B063 QA01 QA18 QQ05 QS11 QS32 QS39 QX01