(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4月16日(16.04.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/075591 A1

(51) 国際特許分類:
C12M 1/34 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/038926

(22) 国際出願日： 2019年10月2日(02.10.2019)

(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 2018-193875 2018年10月12日(12.10.2018) JP

(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). 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

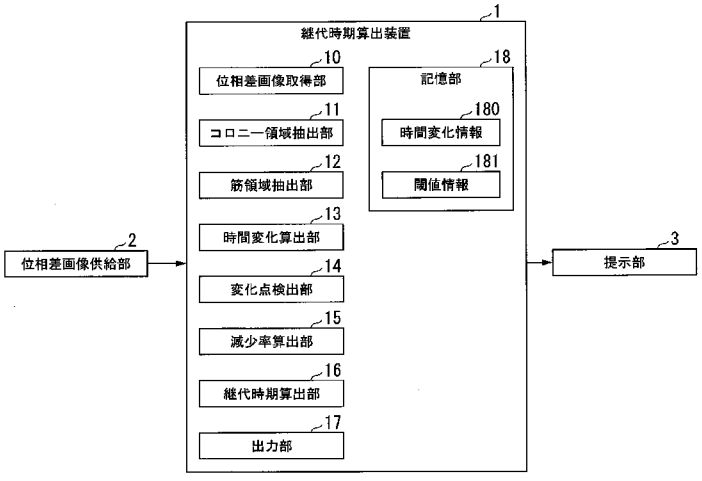
(72) 発明者: 檀 知朗 (DAN Tomoro); 〒1086290 東京都港区港南二丁目１５番３号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 紀伊 宏昭 (KII Hiroaki); 〒1086290 東京都港区港南二丁目１５番３号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 魚住 孝之 (UOZUMI Takayuki); 〒1086290 東京都港区港南二丁目１５番３号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP). 佐藤 美子 (SATO Yoshiko); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 吉田 信介 (YOSHIDA Shinsuke); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外 (NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 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,

(54) **Title:** SUBCULTURE STAGE CALCULATION DEVICE, SUBCULTURE STAGE CALCULATION METHOD, AND PROGRAM

(54) 発明の名称： 継代時期算出装置、継代時期算出方法、及びプログラム



1 Subculture stage calculation device
2 Phase difference image-supplying unit
3 Display unit
10 Phase difference image-acquiring section
11 Colony region-extracting section
12 Striated region-extracting section
13 Time change-calculating section
14 Change point-detecting section
15 Decrement-calculating section
16 Subculture stage-calculating section
17 Output section
18 Storage section
180 Time change information
181 Threshold information

(57) **Abstract:** A subculture stage calculation device is provided with: a time change-calculating section for calculating, from multiple microscope images of pluripotent stem cells taken at different times, time changes in the area occupied by an extracted region, which is a region in which a striated pattern has appeared; a change point-detecting section for detecting a change point in time changes of the area occupied by the extracted region; and a subculture stage-calculating section for determining the subculture stage of the pluripotent stem cells on the basis of said change point.

(57) 要約：継代時期算出装置は、多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出部と、前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出部と、前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出部と、を備える。

WO 2020/075591 A1

[続葉有]

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, 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)）

明　細　書

発明の名称 ：

継代時期算出装置、継代時期算出方法、及びプログラム

技術分野

[0001] 本発明は、継代時期算出装置、継代時期算出方法、及びプログラムに関する。

本願は、２０１８年１０月１２日に、日本に出願された特願２０１８－１９３８７５号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 再生医療等では大量の多能性幹細胞が求められる。目的細胞の細胞数を増やす工程を拡大培養工程というが、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）などの多能性幹細胞の拡大培養においては、多能性幹細胞の多分化能、すなわち未分化な状態を維持したまま拡大培養することが必要である。このためｉＰＳ細胞等のコロニーを形成する細胞では、コロニーを継代することにより拡大培養を行っている。ｉＰＳ細胞である多能性幹細胞は、培養過程において未成熟な状態から、継代培養に適した成熟状態へ変化し、この過程でコロニーの状態が変化していく。拡大培養工程では、コロニーの状態変化（本願では「コロニーの成熟度合」という）に基づいて継代するタイミングの判定を行なう。従来、当該成熟度合は、作業者が目視でコロニー内の細胞の大きさを見て判断を行なっているが、作業者ごとにばらつきが生じることがある。

[0003] 継代培養のタイミングに関する作業者ごとのばらつきを抑制するために、拡大培養後に細胞を回収して細胞懸濁液を作り、細胞懸濁液の単位量あたりの細胞数を測定し、その測定結果に基づいて所望の細胞濃度まで希釈し、継代する作業を自動で行う装置が提案されている（特許文献１）。しかし、特許文献１に記載の装置は、細胞を培養容器から剥離させて回収バッグに回収してから細胞数を測定及び調整し、継代培養を行うので、コロニーの成熟が十分であるか否かは判断することができず、仮に不十分であった場合、培養

を継続してコロニーを成熟させることはできない。接着培養されているコロニーのまま成熟度を判定し、継代するタイミングを予測できる方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０１６／０１３３９４号

発明の概要

[0005] 上記問題を解決するために、本発明の一態様は、多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出部と、前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出部と、前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出部と、を備える継代時期算出装置である。

[0006] 上記問題を解決するために、本発明の一態様は、多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出過程と、前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出過程と、前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出過程と、を有する継代時期算出方法である。

[0007] 上記問題を解決するために、本発明の一態様は、コンピュータに、多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出ステップと、前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出ステップと、前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出ステップと、を実行させるためのプログラムである。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の第１の実施形態に係る継代時期算出装置の構成の一例を示す図である。

[図2]本発明の第１の実施形態に係る位相差画像の一例を示す図である。

[図3]本発明の第１の実施形態に係る継代時期算出装置の処理の一例を示す図である。

[図4]本発明の第１の実施形態に係るコロニー領域に対する筋領域が占める面積の割合（筋領域割合）の時間変化の一例を示す図である。

[図5]本発明の第１の実施形態に係る継代時期算出処理の一例を示す図である。

[図6]本発明の第２の実施形態に係る継代時期算出装置の構成の一例を示す図である。

[図7]本発明の第２の実施形態に係る継代時期算出処理の一例を示す図である。

[図8]本発明の第３の実施形態に係る継代時期算出装置の構成の一例を示す図である。

[図9]本発明の第３の実施形態に係る継代時期算出処理の第１の例を示す図である。

[図10]本発明の第３の実施形態に係る継代時期算出処理の第２の例を示す図である。

[図11]本発明の第１の実施形態に係る筋状の模様の一例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] （第１の実施形態）

以下、図面を参照しながら本発明の実施形態について詳しく説明する。図１は、本実施形態に係る継代時期算出装置１の構成の一例を示す図である。継代時期算出装置１は、多能性幹細胞が撮像された複数の位相差画像ＰＳ（不図示）から、抽出の対象となる領域である抽出対象領域を抽出する。ここで多能性幹細胞とは、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉に属する細胞系列すべてに分化し得る能力（多能性）を潜在的に有し、かつ増殖性を併せ持つ幹

細胞をいい、例えば、ｉＰＳ細胞や胚性幹細胞（ＥＳ細胞）が挙げられる。

[0010] 複数の位相差画像ＰＳとは、多能性幹細胞のコロニーを所定の時間間隔で撮影したタイムラプス画像のセットであり、位相差画像ＰＳのうちの一画像を、位相差画像Ｐ０という。位相差画像Ｐ０の一例を図２に示す。

本実施形態において抽出対象領域とは、位相差画像Ｐ０のうち筋状の模様が現れている領域である。ここで当該筋状の模様について説明するために、ｉＰＳ細胞である多能性幹細胞の培養過程について説明する。

ｉＰＳ細胞である多能性幹細胞は、培養過程において、コロニー未形成状態を初期状態とし、未成熟状態を経て、成熟状態へと変化する。

[0011] コロニー未形成状態とは、多能性幹細胞が単一の細胞であり、コロニーを形成していない状態である。コロニー未成熟状態では、コロニーは形成されているが、一細胞あたりの面積が大きく細胞密度は低い。以下、細胞密度が低い領域を粗領域ともいう。

[0012] 成熟状態とは、多能性幹細胞がコロニーを形成し成熟している状態である。多能性幹細胞が成熟するにつれて、コロニーにおける一細胞あたりの面積は小さくなり細胞密度が高くなる。以下、細胞密度が高い領域を密領域ともいう。成熟状態のコロニーでは、中央に密領域が形成され、当該密領域の周囲を取り囲むように粗領域が存在する。

[0013] コロニー未成熟状態と、成熟状態との間の中間の状態として遷移状態がある。遷移状態とは、多能性幹細胞がコロニーを形成しているが十分に成熟していない状態である。

[0014] 遷移状態では、コロニーの位相差画像Ｐ０に筋領域がみられる。筋領域とは、位相差画像Ｐ０において細長い筋状の模様が複数見られる領域である。多能性幹細胞が成熟するにつれて多能性幹細胞同士が密になった結果、それら複数の多能性幹細胞の間隙のコントラストが高くなり、筋状に見えていると考えられる。図１１に筋状の模様ＳＳの一例を示す。

遷移状態においてコロニーは、筋領域と、当該筋領域の周囲を取り囲む密領域と、当該密領域の周囲を取り囲む粗領域とを含む。

[0015] ここで図２を参照し、筋領域ＳＲについて説明する。

図２は、本実施形態に係るｉＰＳ細胞（京都大学ｉＰＳ細胞研究所で作成した健常ヒト末梢血由来ｉＰＳ細胞株００３）を撮像することにより得られた位相差画像Ｐ０の一例を示す図である。図２では、位相差画像Ｐ０のコロニー領域ＣＲに含まれる筋領域ＳＲの一例として、筋領域ＳＲ１、筋領域ＳＲ２、及び筋領域ＳＲ３が示されている。

コロニー領域ＣＲとは、位相差画像Ｐ０において、多能性幹細胞のコロニーに対応する領域のうち異常領域ＡＲを除く領域である。

[0016] 異常領域ＡＲとは、多能性幹細胞のコロニーに対応する領域のうち多能性幹細胞の状態から逸脱した異常な細胞によって形成される領域である。多能性幹細胞の培養においては、多能性の状態を維持したまま培養することが重要であるが、培養の過程で多能性幹細胞の状態から逸脱した異常な細胞が出現してしまうことがある。

[0017] 図１に戻って継代時期算出装置１の説明を続ける。

継代時期算出装置１は、位相差画像取得部１０と、コロニー領域抽出部１１と、筋領域抽出部１２と、時間変化算出部１３と、変化点検出部１４と、減少率算出部１５と、継代時期算出部１６と、出力部１７と、記憶部１８とを備える。

[0018] 位相差画像取得部１０は、位相差画像供給部２から供給される複数の位相差画像ＰＳを取得する。ここで複数の位相差画像ＰＳとは、時間を変えて多能性幹細胞が透過照明によって撮像された複数の顕微鏡画像の一例である。複数の位相差画像ＰＳは、多能性幹細胞に照射された照明光の透過光の位相差が明暗差に変換されることによって当該多能性幹細胞が時間を変えて撮像されたタイムラプス画像である。複数の位相差画像ＰＳでは、例えば、位相差顕微鏡によって得られた多能性幹細胞の拡大像が撮像されている。

複数の位相差画像ＰＳは、一定の時間間隔において多能性幹細胞が撮像された複数の画像である。

透過照明による顕微鏡画像は、位相差画像以外に、例えば、微分干渉像、

定量位相差像などであってもよい。

[0019] コロニー領域抽出部１１は、各位相差画像Ｐ０から多能性幹細胞のコロニー領域ＣＲを抽出する。

[0020] 筋領域抽出部１２は、各位相差画像Ｐ０において、コロニー領域ＣＲから、筋領域ＳＲを抽出する。筋領域ＳＲとは、抽出対象領域の一例であり、位相差画像Ｐ０において筋状の模様が現れている領域である。

ここで筋領域抽出部１２は、例えば、筋状の高輝度領域に基づいて筋領域ＳＲを抽出することができる。高輝度領域とは、位相差画像Ｐ０を構成する画素のうち基準値よりも大きい輝度値の画素の集まりに基づく領域である。高輝度領域には、基準値よりも大きい輝度値の画素の集まりと、当該画素の集まりの周囲とが含まれる。

[0021] 時間変化算出部１３は、複数の位相差画像ＰＳについて、筋領域ＳＲが占める面積の時間変化Ｇ１を算出する。本実施形態では、時間変化算出部１３は、まず各位相差画像Ｐ０における、筋領域割合Ａを算出する。ここで筋領域割合Ａとは、コロニー領域ＣＲに対する筋領域ＳＲが占める面積の割合である。

時間変化算出部１３は、各位相差画像Ｐ０が撮像された時間と、その時間の筋領域割合Ａとに基づいて、複数の位相差画像ＰＳにおける筋領域割合Ａの時間変化Ｇ１を時間変化情報１８０として記憶部１８に記憶させる。

[0022] 変化点検出部１４は、時間変化算出部１３によって算出された時間変化Ｇ１の変化点Ｍ１を検出する。ここで変化点Ｍ１とは、コロニー領域ＣＲ全体の面積に占める筋領域ＳＲの面積の割合が、一旦増加した後減少し始める時間を示す点である。変化点Ｍ１は、一例として、時間変化Ｇ１の傾きが正から負へと変化する点である。つまり、変化点Ｍ１は、時間変化Ｇ１の極大値である。

[0023] 本発明者らは、多能性幹細胞のコロニーを未成熟状態から成熟状態まで培養すると、コロニー領域ＣＲ全体の面積に占める筋領域ＳＲの面積の割合（筋領域割合Ａ）が、一旦増加した後減少し、最終的には筋領域ＳＲがほとん

どなくなることを見出した。したがって、筋領域割合Ａの変化に基づいて、成熟度を判断することが可能である。

[0024] 減少率算出部１５は、時間変化算出部１３によって算出された時間変化Ｇ１について、変化点検出部１４によって検出された変化点Ｍ１より後のコロニー領域ＣＲに対する筋領域ＳＲが占める面積の減少率Ｄを算出する。

[0025] 本実施形態では、減少率算出部１５は、時間変化Ｇ１について、変化点Ｍ１より後の筋領域割合Ａの減少率Ｄを算出する。ここで減少率Ｄとは、一例として、筋領域割合Ａの時間あたりの減少量である。

[0026] 継代時期算出部１６は、変化点Ｍ１に基づいて多能性幹細胞の継代時期ＰＴを算出する。

本実施形態では、継代時期算出部１６は、減少率Ｄと、所定の閾値ＴＨとに基づいて多能性幹細胞の継代時期ＰＴを算出する。本実施形態では、継代時期算出部１６は、減少率Ｄから、筋領域割合Ａが、閾値情報１８１が示す閾値ＴＨ以下となる時期を、継代時期ＰＴとして算出する。ここで閾値情報１８１は、筋領域割合Ａの所定の閾値を示す情報である。

[0027] 出力部１７は、継代時期ＰＴを提示部３に出力し、提示部３に継代時期ＰＴを表示させる。なお、出力部１７は、提示部３以外の出力装置や、記憶装置などに継代時期ＰＴを出力してもよい。

記憶部１８には、時間変化情報１８０、及び閾値情報１８１が記憶される。

[0028] 位相差画像供給部２は、継代時期算出装置１に複数の位相差画像ＰＯを供給する。位相差画像供給部２は、例えば、位相差顕微鏡を備える撮像装置である。

提示部３は、継代時期算出装置１から供給される継代時期ＰＴを提示する。提示部３は、例えば、ディスプレイなどの表示装置である。

[0029] 次に図３～図５を参照し、継代時期算出装置１が継代時期ＰＴを算出する処理について説明する。

図３は、本実施形態に係る継代時期算出装置１の処理の一例を示す図であ

る。

ステップＳ１００：継代時期算出装置１は、複数の位相差画像ＰＳの撮像時間毎に継代時期ＰＴを算出する処理を開始する。ここで、本実施形態では、複数の位相差画像ＰＳのフレーム数Ｎは予め決められている。継代時期算出装置１は、継代時期ＰＴを算出する処理を、予め決められたフレーム数Ｎだけ繰り返す。

[0030] ステップＳ１１０：位相差画像取得部１０は、位相差画像供給部２から供給される位相差画像Ｐ０を取得する。ここで位相差画像供給部２は、位相差画像Ｐ０を撮像する度に、撮像した位相差画像Ｐ０を継代時期算出装置１に供給する。

位相差画像取得部１０は、取得した位相差画像Ｐ０を、コロニー領域抽出部１１及び筋領域抽出部１２に供給する。

[0031] ステップＳ１２０：コロニー領域抽出部１１は、位相差画像取得部１０によって取得された位相差画像Ｐ０から多能性幹細胞のコロニー領域ＣＲを抽出する。コロニー領域抽出部１１は、例えば、公知のエッジ検出に基づいて位相差画像Ｐ０から細胞領域を抽出し、抽出した細胞領域から所定の面積より広い細胞領域をコロニー領域ＣＲとして抽出する。コロニー領域抽出部１１は、抽出したコロニー領域ＣＲを、筋領域抽出部１２及び時間変化算出部１３に供給する。

なお、コロニー領域ＣＲの抽出は、細胞領域の面積に基づいて行う方法に限定されず、公知の様々な方法により行うことができる。

[0032] ここでコロニー領域抽出部１１は、周囲のハロの有無に基づいて異常領域ＡＲを除いた領域を、コロニー領域ＣＲとして抽出してもよい。

ハロとは、位相差画像のうち、一方の領域と他方の領域との位相差が大きく、結果一方の領域と他方の領域との境界において周囲よりも輝度が高くなっている部分である。正常な多能性幹細胞のコロニーは、周囲にハロが多く見られ、異常細胞のコロニーは、周囲にハロがあまり見られない。

[0033] したがって、コロニー領域ＣＲは、コロニーが形成される領域のうち位相

差が所定の値以上である部分を周囲に有する領域とすることができる。異常領域ＡＲは、コロニー領域ＣＲのうち位相差が所定の値以上である部分を周囲に有さない領域とすることができる。

[0034] ステップＳ１３０：筋領域抽出部１２は、位相差画像Ｐ０において、コロニー領域ＣＲから、筋領域ＳＲを抽出する。ここで筋領域抽出部１２は、筋状の高輝度領域に基づいて筋領域ＳＲを抽出することができる。筋領域抽出部１２は、抽出した筋領域ＳＲを時間変化算出部１３に供給する。

[0035] ステップＳ１４０：時間変化算出部１３は、コロニー領域ＣＲに対して筋領域ＳＲが占める面積の割合（筋領域割合Ａ）の時間変化Ｇ１を算出する。

[0036] 時間変化算出部１３は、まず各位相差画像Ｐ０について筋領域割合Ａを算出する。ここで便宜的に、複数の位相差画像ＰＳのうち、今回取得した位相差画像Ｐ０を位相差画像P_nとし、それまでに取得した位相差画像を位相差画像P_0～P_{n-1}とする。時間変化算出部１３は、記憶部１８から位相差画像P_0～P_{n-1}に基づいて算出した時間変化情報１８０を取得し、取得した時間変化情報１８０が示す時間変化Ｇ１に、位相差画像P_nの撮像時間と、算出した面積の割合との組を追加することによって、位相差画像P_0～P_nに基づく時間変化Ｇ１を算出する。

時間変化算出部１３は、位相差画像P_0～P_nに基づいて算出した時間変化Ｇ１を時間変化情報１８０として記憶部１８に記憶させる。また、時間変化算出部１３は、算出した時間変化Ｇ１を変化点検出部１４に供給する。

[0037] 上述したように、時間変化算出部１３は、複数の位相差画像ＰＳから、筋領域割合Ａの時間変化Ｇ１を算出する。

[0038] ステップＳ１５０：変化点検出部１４は、時間変化Ｇ１の変化点Ｍ１を検出する。

[0039] ここで図４を参照し、時間変化Ｇ１について説明する。

図４は、本実施形態に係るコロニー領域ＣＲに対する筋領域ＳＲが占める面積の割合（筋領域割合Ａ）の時間変化Ｇ１の一例を示す図である。時間変化Ｇ１では、位相差画像Ｐ０が撮像されたそれぞれの時間に対して、筋領域

割合Ａが示されている。

なお、図４に示す時間変化Ｇ１の例は、筋領域割合Ａの時間変化Ｇ１を模した仮想データである。

[0040] 図４に示す時間変化Ｇ１では、筋領域割合Ａは、点Ｘ１まで増加し点Ｘ１から減少し始めている。変化点検出部１４は、隣り合った点における筋領域割合Ａを比較し、点Ｘ１までは筋領域割合Ａが増加し、点Ｘ１から点Ｘ２で筋領域割合Ａが初めて減少していると判定した場合、点Ｘ１を変化点Ｍ１として検出する。

[0041] また、変化点検出部１４は、時間変化Ｇ１の変化点Ｍ１を、時間変化Ｇ１の傾きが正から負へと変化する点として検出してもよい。このように、本実施形態では、変化点Ｍ１を簡便に検出できる。

[0042] また、変化点検出部１４は、時間変化Ｇ１の３つ以上の連続した点において筋領域割合Ａが減少している場合に、当該３つ以上の連続した点のいずれか（例えば撮像時間の最も新しい点）を変化点Ｍ１として検出してもよい。ここで時間変化Ｇ１において複数の点が連続しているとは、複数の点に対応する撮像時間の間に、当該複数の点以外の点に対応する撮像時間が存在しないことである。つまり、複数の位相差画像ＰＳが撮像された時間がフレームとして連続していることである。

[0043] 例えば、変化点検出部１４は、時間変化Ｇ１において連続する点Ｘ１、点Ｘ２、及び点Ｘ３について、点Ｘ２における筋領域割合Ａが点Ｘ１における筋領域割合Ａから減少し、かつ点Ｘ３における筋領域割合Ａが点Ｘ２における筋領域割合Ａから減少している場合、点Ｘ１を変化点Ｍ１として検出してもよい。

継代時期算出装置１では、連続した３つの点に基づいて筋領域割合Ａが減少しているかを判定する場合の方が、連続した２つの点に基づいて判定する場合に比べて、変化点Ｍ１の検出の精度を高くできる。

[0044] また、変化点検出部１４は、時間変化Ｇ１の傾きが所定の負の値よりも小さい場合に、当該傾きを算出するのに用いた時間変化Ｇ１における点のうち

最も早い撮像時間に対応する点を、変化点Ｍ１として検出してもよい。

[0045] なお、変化点検出部１４が変化点Ｍ１の検出に用いる時間変化Ｇ１における２つ以上の点は、連続していなくてもよい。

[0046] 図３に戻って継代時期算出装置１の処理の説明を続ける。

ステップＳ１５５：変化点検出部１４は、変化点Ｍ１を検出したか否かを判定する。変化点検出部１４は、ステップＳ１５０において変化点Ｍ１を検出した場合、変化点Ｍ１を検出したと判定し、ステップＳ１５０において変化点Ｍ１を検出していない場合、変化点Ｍ１を検出していないと判定する。

[0047] 変化点検出部１４は、変化点Ｍ１を検出したと判定する場合（ステップＳ１５５；ＹＥＳ）、検出した変化点Ｍ１を示す変化点情報を減少率算出部１５に供給する。その後、継代時期算出装置１は、ステップＳ１６０の処理を実行する。

一方、変化点検出部１４が、変化点Ｍ１を検出していないと判定する場合（ステップＳ１５５；ＮＯ）、継代時期算出装置１は、ステップＳ１８０の処理を実行する。

[0048] ステップＳ１６０：継代時期算出部１６及び減少率算出部１５は、継代時期算出処理を行う。

ここで図５を参照し、継代時期算出処理について説明する。

図５は、本実施形態に係る継代時期算出処理の一例を示す図である。

[0049] ステップＳ２００：減少率算出部１５は、時間変化Ｇ１について、変化点Ｍ１より後の筋領域割合Ａの減少率Ｄを算出する。ここで変化点Ｍ１より後とは、変化点Ｍ１に対応する位相差画像Ｐ０の撮像時間以降の撮像時間の範囲をいう。

減少率算出部１５は、算出した減少率Ｄを継代時期算出部１６に供給する。

[0050] ここで再び図４を参照し、減少率算出部１５が減少率を算出する処理について説明する。

減少率算出部１５は、一例として、点Ｘ２に対応する筋領域割合Ａと点Ｘ

１に対応する筋領域割合Ａとの差を、点Ｘ２に対応する位相差画像Ｐ０の撮像時間と点Ｘ１に対応する位相差画像Ｐ０の撮像時間との差によって除算することによって筋領域割合Ａの減少率を算出する。つまり、本実施形態では、減少率Ｄとは、点Ｘ１と点Ｘ２とを結ぶ直線の傾きの値である。

[0051] なお、減少率算出部１５は、時間変化Ｇ１のうち変化点Ｍ１より後の複数の点に基づいて、筋領域割合Ａの減少率Ｄを算出してもよい。変化点Ｍ１より後の複数の点とは、点Ｘ１、及び点Ｘ２に加えて、点Ｘ２より後の１つ以上の点である。

[0052] 図５に戻って継代時期算出処理の説明を続ける。

ステップＳ２１０：継代時期算出部１６は、減少率算出部１５によって算出された減少率Ｄと記憶部１８から取得する閾値情報１８１が示す閾値ＴＨとに基づいて多能性幹細胞の継代時期ＰＴを算出する。

[0053] ここで継代時期算出部１６は、２回目以降のステップＳ２１０の処理において算出した継代時期ＰＴが、前回のステップＳ２１０の処理において算出した継代時期ＰＴと異なる場合、新たに算出した継代時期ＰＴによって継代時期ＰＴを修正する。継代時期算出部１６は、修正した継代時期ＰＴを継代時期ＰＴとして算出する。

継代時期算出部１６は、算出した継代時期ＰＴを出力部１７に供給する。

[0054] 継代時期算出装置１では、継代時期ＰＴを算出する処理を複数の位相差画像ＰＳのフレーム数Ｎだけ繰り返して継続するため、一度算出した継代時期ＰＴを修正できるため、継代時期ＰＴの精度を高くできる。

[0055] ここで再び図４を参照し、継代時期算出部１６が継代時期ＰＴを算出する処理について説明する。

継代時期算出部１６は、減少率Ｄに基づいて、筋領域割合Ａが閾値ＴＨ以下となる時間を算出する。ここで閾値ＴＨは、一例として１５パーセントである。継代時期算出部１６は、算出した時間を継代時期ＰＴとする。

[0056] 上述したように、減少率Ｄとは、点Ｘ１と点Ｘ２とを結ぶ直線の傾きの値であるから、本実施形態では、一例として、継代時期算出部１６は、変化点

Ｍ１より後の時間変化Ｇ１の一次式による近似に基づいて継代時期ＰＴを算出する。

[0057] なお、継代時期算出部１６は、時間変化Ｇ１において変化点Ｍ１より後の複数の点を用いて、時間変化Ｇ１の変化点Ｍ１より後の範囲を近似する近似曲線を算出してもよい。継代時期算出部１６は、算出した近似曲線に基づいて、筋領域割合Ａが閾値ＴＨ以下となる位相差画像Ｐ０の撮像時間を算出してもよい。

[0058] 図３に戻って継代時期算出装置１の処理の説明を続ける。

ステップＳ１７０：出力部１７は、継代時期算出部１６によって算出された継代時期ＰＴを提示部３に出力し、提示部３に継代時期ＰＴを表示させる。

ステップＳ１８０：継代時期算出装置１は、複数の位相差画像ＰＳの撮像時間毎に継代時期ＰＴを算出する処理をフレーム数Ｎだけ実行した場合、当該処理を終了する。

[0059] なお、本実施形態においては、位相差画像供給部２は、位相差画像Ｐ０を撮像する度に、撮像した位相差画像Ｐ０を継代時期算出装置１に供給する場合について説明したが、これに限らない。位相差画像供給部２は、撮像した位相差画像Ｐ０を所定のタイミングにおいて複数まとめて継代時期算出装置１に供給してもよい。

[0060] 以上に説明したように、本実施形態に係る継代時期算出装置１は、時間変化算出部１３と、変化点検出部１４と、継代時期算出部１６とを備える。

時間変化算出部１３は、時間を変えて多能性幹細胞が透過照明によって撮像された複数の顕微鏡画像（この一例において、複数の位相差画像ＰＳ）から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域（この一例において、筋領域ＳＲ）が占める面積（この一例において、筋領域割合Ａ）の時間変化Ｇ１を算出する。

[0061] この構成により、本実施形態に係る継代時期算出装置１は、継代するタイミングを予測できるため、適切なタイミングで継代をすることが可能となる。本発明者らは、多能性幹細胞のコロニーが成熟状態を過ぎて成熟しきった

過成熟状態になると、継代後の生着や増殖が悪いことを見出した。しかし、本実施形態に係る継代時期算出装置１によれば、適切な閾値ＴＨを設定することにより、最適な継代タイミングを予測することができ、培養中の多能性幹細胞が過成熟になるリスクを軽減できる。

[0062] また、本実施形態に係る継代時期算出装置１は、減少率算出部１５を備える。

減少率算出部１５は、時間変化Ｇ１について、変化点Ｍ１より後の面積（この一例において、筋領域割合Ａ）の減少率Ｄを算出する。

継代時期算出部１６は、減少率Ｄと、所定の閾値ＴＨとに基づいて継代時期ＰＴを算出する。

[0063] この構成により、本実施形態に係る継代時期算出装置１では、筋領域割合Ａの減少率Ｄを算出し、算出した減少率Ｄに基づいて継代時期ＰＴを算出できるため、減少率Ｄを算出しない場合に比べて継代時期ＰＴの算出の精度を高くできる。

[0064]（第２の実施形態）

以下、図面を参照しながら本発明の第２の実施形態について詳しく説明する。

上記第１の実施形態では、継代時期算出装置は、筋領域割合Ａの減少率と、所定の閾値とに基づいて継代時期を算出する場合について説明をした。本実施形態では、継代時期算出装置が、多能性幹細胞の種類毎に変化点と継代時期とが予め対応づけられた継代時期情報に基づいて継代時期を算出する場合について説明をする。

本実施形態に係る継代時期算出装置を継代時期算出装置１ａという。

[0065] 図６は、本実施形態に係る継代時期算出装置１ａの構成の一例を示す図である。本実施形態に係る継代時期算出装置１ａ（図６）と第１の実施形態に係る継代時期算出装置１（図２）とを比較すると、継代時期算出部１６ａ、及び記憶部１８ａが異なる。ここで、他の構成要素（位相差画像取得部１０、コロニー領域抽出部１１、筋領域抽出部１２、時間変化算出部１３、変化

点検出部１４、減少率算出部１５、及び出力部１７）が持つ機能は第１の実施形態と同じである。第１の実施形態と同じ機能の説明は省略し、第２の実施形態では、第１の実施形態と異なる部分を中心に説明する。

[0066] 継代時期算出部１６ａは、変化点Ｍ１と、継代時期情報１８１ａとに基づいて継代時期ＰＴを算出する。継代時期情報１８１ａとは、多能性幹細胞の種類毎に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め対応づけられた情報である。

[0067] 記憶部１８には、時間変化情報１８０、及び継代時期情報１８１ａが記憶される。

ここで継代時期情報１８１ａは、例えば、実施形態１において説明した継代時期算出装置１が継代時期算出する処理（図３）に基づいて、多能性幹細胞の種類毎に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め算出されて記憶部１８に記憶される。

[0068] 次に図７を参照し、継代時期算出装置１ａが継代時期ＰＴを算出する処理について説明する。継代時期算出装置１ａが継代時期ＰＴを算出する処理と、第１実施形態の継代時期算出装置１が継代時期を算出する処理（図３）とでは、ステップＳ１６０の継代時期算出処理が異なる。

[0069] 図７は、本実施形態に係る継代時期算出処理の一例を示す図である。

ステップＳ３００：継代時期算出部１６ａは、記憶部１８ａから継代時期情報１８１ａを取得する。

[0070] ステップＳ３１０：継代時期算出部１６ａは、変化点Ｍ１と、継代時期情報１８１ａとに基づいて継代時期ＰＴを算出する。ここで継代時期算出部１６ａは、継代時期情報１８１ａのうち多能性幹細胞の種類に対応する情報を選択し、選択した当該情報から変化点Ｍ１に対応する継代時期ＰＴを読み出すことによって継代時期ＰＴを算出する。

[0071] 以上に説明したように、本実施形態に係る継代時期算出装置１ａでは、継代時期算出部１６ａは、変化点検出部１４によって検出された変化点Ｍ１と、多能性幹細胞の種類毎に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め対応づけられた継代時期情報１８１ａとに基づいて継代時期ＰＴを算出する。

[0072] この構成により、本実施形態に係る継代時期算出装置１ａでは、多能性幹細胞の種類毎に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め対応づけられた継代時期情報１８１ａに基づいて継代時期ＰＴを算出できるため、継代時期情報１８１ａに基づかない場合に比べて処理の負荷を軽減できる。

[0073] なお、本実施形態では、継代時期情報１８１ａは、多能性幹細胞の種類毎に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め対応付けられたものとしたが、継代時期情報１８１ａは、多能性幹細胞の種類及び数に変化点Ｍ１と継代時期ＰＴとが予め対応づけられたものとしてもよい。

[0074]（第３の実施形態）

以下、図面を参照しながら本発明の第３の実施形態について詳しく説明する。

上記第１の実施形態及び第２の実施形態では、継代時期算出装置は、継代時期を算出する処理を複数の位相差画像のフレーム数だけ繰り返して継続する場合について説明をした。本実施形態では、継代時期算出装置が、継代時期を算出すると当該処理を中止する場合について説明をする。また、本実施形態では、継代時期算出装置が、多能性幹細胞が撮像される時間間隔を変更する場合について説明をする。

本実施形態に係る継代時期算出装置を継代時期算出装置１ｂという。

[0075] 図８は、本実施形態に係る継代時期算出装置１ｂの構成の一例を示す図である。本実施形態に係る継代時期算出装置１ｂ（図８）と第１の実施形態に係る継代時期算出装置１（図２）とを比較すると、撮像終了指示部１９ｂ、及び撮像時間間隔変更部２０ｂが異なる。ここで、他の構成要素（位相差画像取得部１０、コロニー領域抽出部１１、筋領域抽出部１２、時間変化算出部１３、変化点検出部１４、減少率算出部１５、継代時期算出部１６、及び出力部１７）が持つ機能は第１の実施形態と同じである。第１の実施形態と同じ機能の説明は省略し、第３の実施形態では、第１の実施形態と異なる部分を中心に説明する。

[0076] 撮像終了指示部１９ｂは、継代時期算出部１６によって継代時期ＰＴが算

出された場合に、多能性幹細胞の撮像の終了を示す終了指示を位相差画像供給部２に供給する。

撮像時間間隔変更部２０ｂは、変化点検出部１４によって変化点Ｍ１が検出された後に、多能性幹細胞が撮像される時間間隔を長くすることを示す撮像時間変更指示を位相差画像供給部２に供給する。

[0077] 次に図９を参照し、継代時期算出装置１ｂが継代時期ＰＴを算出する処理について説明する。継代時期算出装置１ｂが継代時期ＰＴを算出する処理と、第１実施形態の継代時期算出装置１が継代時期算出する処理（図３）とでは、ステップＳ１６０の継代時期算出処理が異なる。

なお、継代時期算出装置１ｂが継代時期ＰＴを算出する処理においては、複数の位相差画像ＰＳのフレーム数は、予め決まっていなくてよい。

[0078] 図９を参照し、継代時期算出装置１ｂの継代時期算出処理について説明する。

図９は、本実施形態に係る継代時期算出処理の第１の例を示す図である。なお、ステップＳ４００、及びステップＳ４１０の各処理は、図５におけるステップＳ２００、及びステップＳ２１０の各処理と同様であるため、説明を省略する。

ステップＳ４２０：撮像終了指示部１９ｂは、終了指示を位相差画像供給部２に供給する。つまり、撮像終了指示部１９ｂは、継代時期算出部１６によって継代時期ＰＴが算出された場合に、多能性幹細胞の撮像の終了を指示する。

[0079] 位相差画像供給部２は、撮像終了指示部１９ｂから供給される終了指示に基づいて、タイムラプス撮影を終了する。

継代時期算出装置１ｂでは、継代時期ＰＴが算出された場合に多能性幹細胞の撮像を終了できるため、複数の位相差画像ＰＳのデータ量を削減できる。

[0080] 次に図１０を参照し、継代時期算出装置１ｂの継代時期算出処理の別の一例について説明する。

図１０は、本実施形態に係る継代時期算出処理の第２の例を示す図である。なお、ステップＳ５１０、及びステップＳ５２０の各処理は、図５におけるステップＳ２００、及びステップＳ２１０の各処理と同様であるため、説明を省略する。

なお、図１０の継代時期算出処理の開始前に、変化点検出部１４は、図２のステップＳ１５５において変化点を検出したことを示す情報を撮像時間間隔変更部２０ｂに供給する。

[0081] ステップＳ５００：撮像時間間隔変更部２０ｂは、撮像時間変更指示を位相差画像供給部２に供給する。つまり、撮像時間間隔変更部２０ｂは、変化点検出部１４によって変化点Ｍ１が検出された後に、多能性幹細胞が撮像される時間間隔を変更する。

位相差画像供給部２は、撮像時間間隔変更部２０ｂから供給される撮像時間変更指示に基づいて、タイムラプス撮影の撮像時間間隔を変更前の長さから長くする。

[0082] なお、撮像時間間隔変更部２０ｂは、継代時期算出部１６によって継代時期ＰＴが算出された後に、撮像時間変更指示を位相差画像供給部２に供給してもよい。つまり、撮像時間間隔変更部２０ｂは、継代時期算出部１６によって継代時期ＰＴが算出された後に、多能性幹細胞が撮像される時間間隔を変更してもよい。

[0083] なお、撮像時間間隔変更部２０ｂは、時間変化算出部１３によって算出される筋領域割合Ａが所定の割合以上となる場合に、タイムラプス撮影の撮像時間の間隔を筋領域割合Ａが所定の値以上となる前の撮像時間の間隔の長さから短くしてもよい。ここで所定の割合とは、例えば、ゼロである。つまり、撮像時間間隔変更部２０ｂは、複数の位相差画像ＰＳにおいて筋領域ＳＲが出現すると、筋領域ＳＲが出現した後の撮像時間の間隔の長さを短くする。

[0084] 継代時期ＰＴを算出するためには、筋領域ＳＲが出現した後の時間変化Ｇ１が用いられるため、継代時期算出装置１ｂでは、筋領域ＳＲが出現した後

の撮像時間の間隔の長さを短くすることによって、複数の位相差画像ＰＳのフレーム数Ｎに対する継代時期ＰＴの算出の精度を高くできる。

[0085] また、撮像時間間隔変更部２０ｂは、時間変化算出部１３によって算出される筋領域割合Ａが所定の割合以上となる前のタイムラプス撮影の撮像時間の間隔を、所定の時間の長さよりも長くしてよい。

[0086] 継代時期ＰＴを算出するためには、筋領域ＳＲが出現した後の時間変化Ｇ１が用いられるため、継代時期算出装置１ｂでは、筋領域ＳＲが出現する前の時間変化Ｇ１について撮像時間の間隔を所定の時間の長さよりも長くすることによって、筋領域ＳＲが出現する前の複数の位相差画像ＰＳのデータ量を削減できる。

[0087] 以上に説明したように、本実施形態に係る継代時期算出装置１ｂは、撮像時間間隔変更部２０ｂを備える。撮像時間間隔変更部２０ｂは、変化点検出部１４によって変化点Ｍ１が検出された後に、多能性幹細胞が撮像される時間間隔を変更する。

[0088] この構成により、本実施形態に係る継代時期算出装置１ｂでは、変化点Ｍ１が検出された後に多能性幹細胞が撮像される時間間隔を長くできるため、複数の位相差画像ＰＳのデータ量を削減できる。

[0089] なお、本発明者らは、筋領域が出現したコロニーはその後成熟する確率が高く、筋領域が観察されないコロニーは、成熟しない可能性が高いことも見出した。したがって、上述した実施形態における継代時期算出装置１、１ａ、１ｂは、筋領域抽出部１２が所定の期間内に、筋領域を抽出しない場合や、筋領域の面積が所定の面積に達しない場合に、培養中止と判定し、この判定結果を提示部３に表示する機能を有していてもよい。

[0090] なお、上述した実施形態における継代時期算出装置１、１ａ、１ｂの一部、例えば、位相差画像取得部１０、コロニー領域抽出部１１、筋領域抽出部１２、時間変化算出部１３、変化点検出部１４、減少率算出部１５、継代時期算出部１６、１６ａ、出力部１７、撮像終了指示部１９ｂ、及び撮像時間間隔変更部２０ｂをコンピュータで実現するようにしてもよい。その場合、

この制御機能を実現するためのプログラムをコンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録して、この記録媒体に記録されたプログラムをコンピュータシステムに読み込ませ、実行することによって実現してもよい。なお、ここでいう「コンピュータシステム」とは、継代時期算出装置１、１ａ、１ｂに内蔵されたコンピュータシステムであって、ＯＳや周辺機器等のハードウェアを含むものとする。また、「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、フレキシブルディスク、光磁気ディスク、ＲＯＭ、ＣＤ－ＲＯＭ等の可搬媒体、コンピュータシステムに内蔵されるハードディスク等の記憶装置のことをいう。さらに「コンピュータ読み取り可能な記録媒体」とは、インターネット等のネットワークや電話回線等の通信回線を介してプログラムを送信する場合の通信線のように、短時間、動的にプログラムを保持するもの、その場合のサーバやクライアントとなるコンピュータシステム内部の揮発性メモリのように、一定時間プログラムを保持しているものも含んでもよい。また上記プログラムは、前述した機能の一部を実現するためのものであってもよく、さらに前述した機能をコンピュータシステムにすでに記録されているプログラムとの組み合わせで実現できるものであってもよい。

また、上述した実施形態における継代時期算出装置１、１ａ、１ｂの一部、または全部を、ＬＳＩ（Ｌａｒｇｅ　Ｓｃａｌｅ　Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ）等の集積回路として実現してもよい。継代時期算出装置１、１ａ、１ｂの各機能ブロックは個別にプロセッサ化してもよいし、一部、または全部を集積してプロセッサ化してもよい。また、集積回路化の手法はＬＳＩに限らず専用回路、または汎用プロセッサで実現してもよい。また、半導体技術の進歩によりＬＳＩに代替する集積回路化の技術が出現した場合、当該技術による集積回路を用いてもよい。

[0091] 以上、図面を参照してこの発明の一実施形態について詳しく説明してきたが、具体的な構成は上述のものに限られることはなく、この発明の要旨を逸脱しない範囲内において様々な設計変更等をすることが可能である。

符号の説明

[0092] １、１ａ、１ｂ…継代時期算出装置、２…位相差画像供給部、３…提示部、１０…位相差画像取得部、１１…コロニー領域抽出部、１２…筋領域抽出部、１３…時間変化算出部、１４…変化点検出部、１５…減少率算出部、１６、１６ａ…継代時期算出部、１７…出力部、１８、１８ａ…記憶部、１８０…時間変化情報、１８１…閾値情報、１８１ａ…継代時期情報、１９ｂ…撮像終了指示部、２０ｂ…撮像時間間隔変更部

請求の範囲

[請求項1] 多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出部と、

前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出部と、

前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出部と、

を備える継代時期算出装置。

[請求項2] 前記時間変化算出部によって算出された前記時間変化について、前記変化点検出部によって検出された前記変化点より後の前記面積の減少率を算出する減少率算出部、

をさらに備え、

前記継代時期算出部は、前記減少率算出部によって算出された前記減少率と、所定の閾値とに基づいて前記継代時期を算出する

請求項１に記載の継代時期算出装置。

[請求項3] 前記継代時期算出部は、前記変化点検出部によって検出された前記変化点と、前記多能性幹細胞の種類毎に前記変化点と前記継代時期とが予め対応づけられた継代時期情報とに基づいて前記継代時期を決定する

請求項１に記載の継代時期算出装置。

[請求項4] 前記筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化は、前記顕微鏡画像における多能性幹細胞のコロニー領域の面積に対して前記抽出対象領域の面積が占める割合の時間変化として算出される

請求項１から請求項３のいずれか一項に記載の継代時期算出装置。

[請求項5] 前記変化点検出部によって前記変化点が検出された後に、前記多能性幹細胞が撮像される時間間隔を変更する撮像時間間隔変更部

をさらに備える請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の継代時期算出装置。

[請求項6] 多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出過程と、

前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出過程と、

前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出過程と、

を有する継代時期算出方法。

[請求項7] コンピュータに、

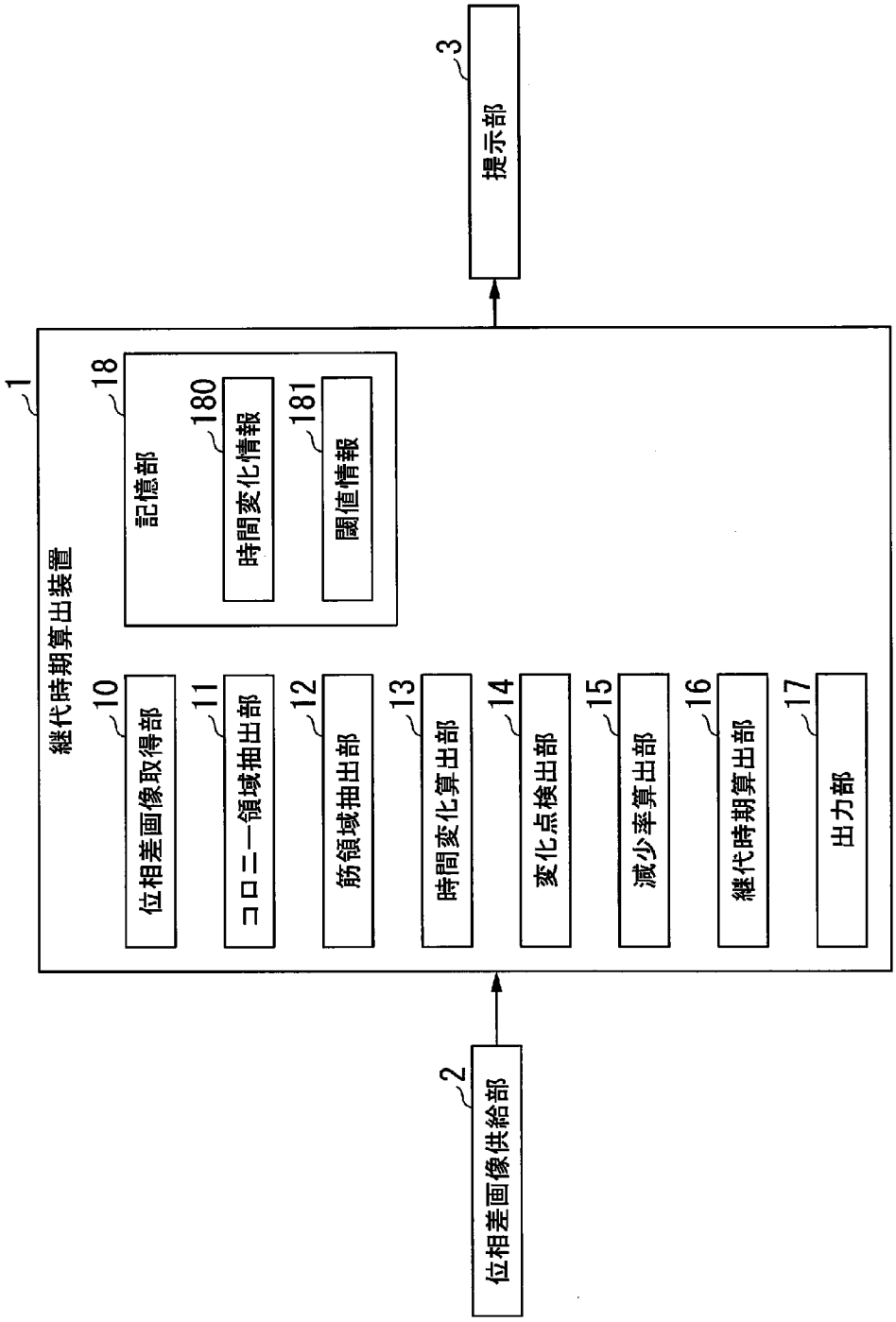
多能性幹細胞が時間を変えて撮像された複数の顕微鏡画像から、筋状の模様が現れている領域である抽出対象領域が占める面積の時間変化を算出する時間変化算出ステップと、

前記抽出対象領域が占める面積の時間変化の変化点を検出する変化点検出ステップと、

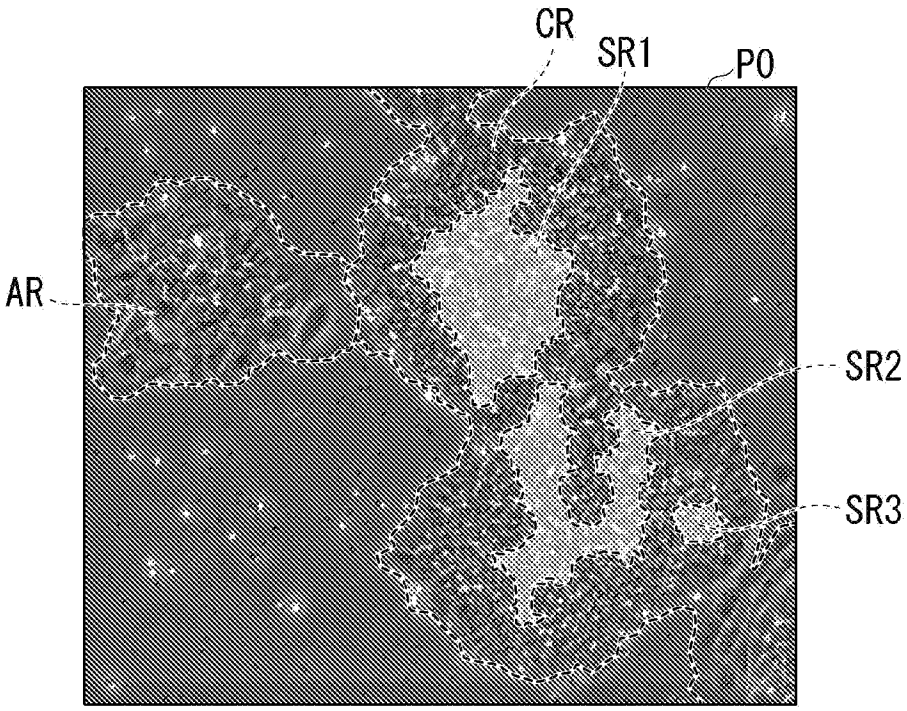
前記変化点に基づいて前記多能性幹細胞の継代時期を決定する継代時期算出ステップと、

を実行させるためのプログラム。

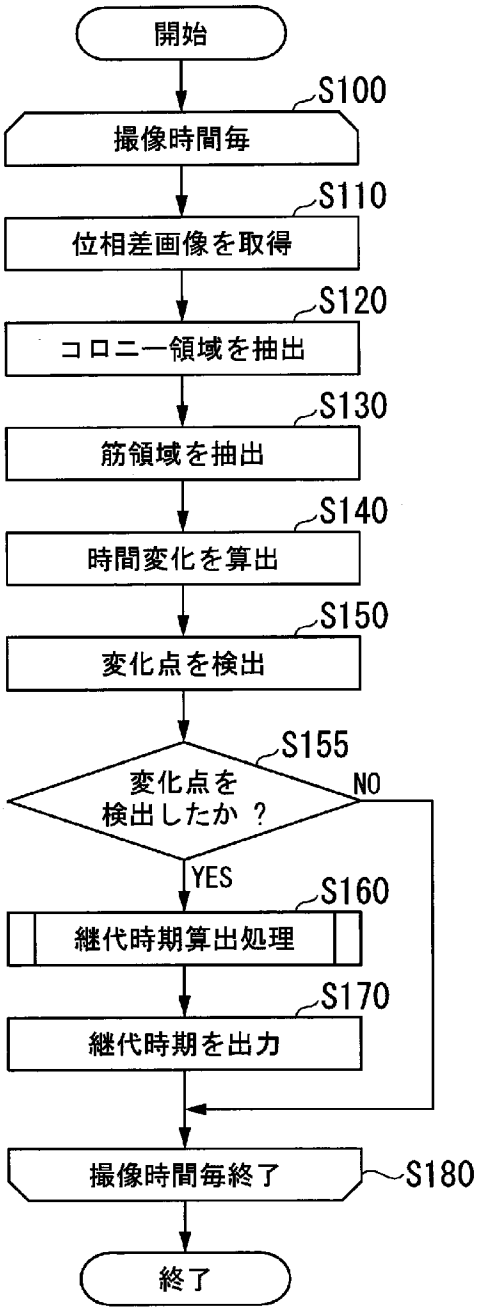
[図1]


1
継代時期算出装置
2
位相差画像供給部
3
提示部
10
位相差画像取得部
11
コロニー領域抽出部
12
筋領域抽出部
13
時間変化算出部
14
変化点検出部
15
減少率算出部
16
継代時期算出部
17
出力部
18
記憶部
180
時間変化情報
181
閾値情報

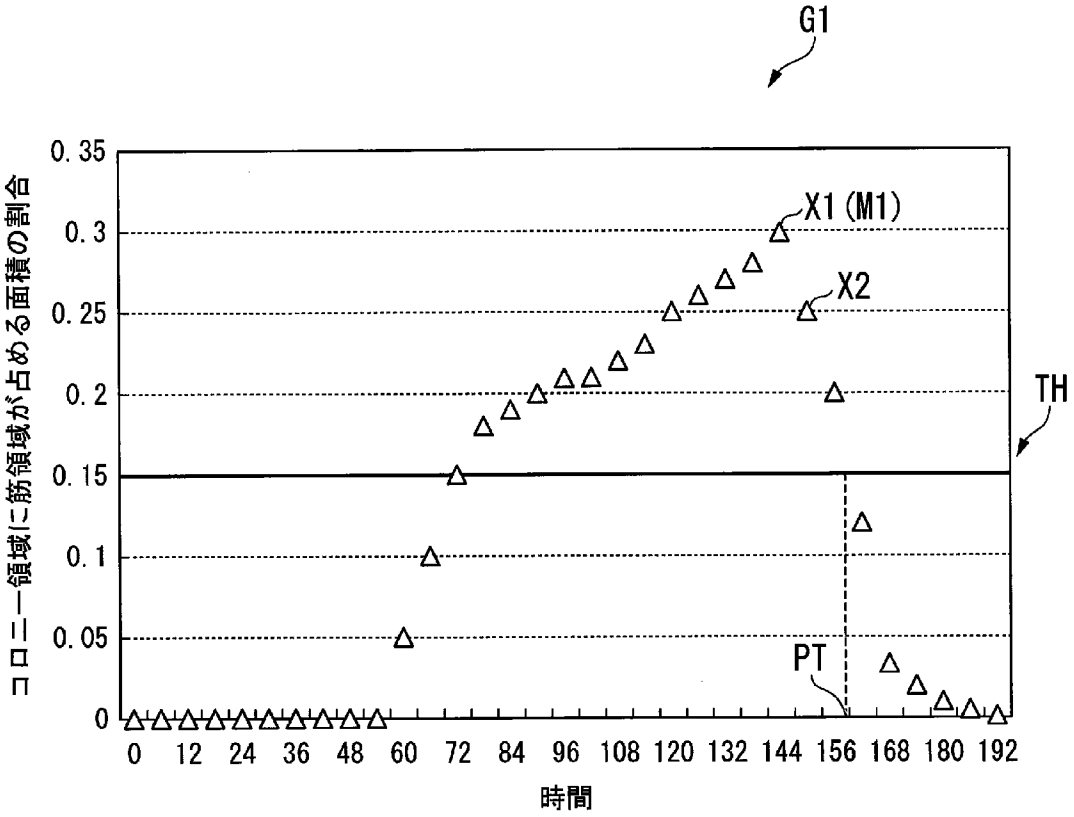
[図2]



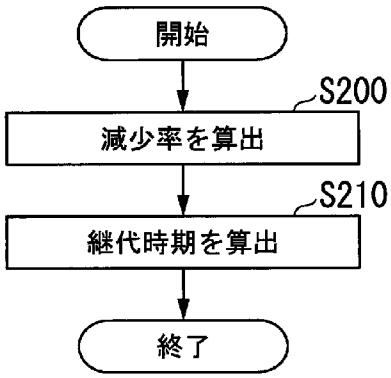
[図3]


開始
S100
撮像時間毎
S110
位相差画像を取得
S120
コロニー領域を抽出
S130
筋領域を抽出
S140
時間変化を算出
S150
変化点を検出
S155
変化点を
検出したか ？
NO
YES
S160
継代時期算出処理
S170
継代時期を出力
撮像時間毎終了
S180
終了

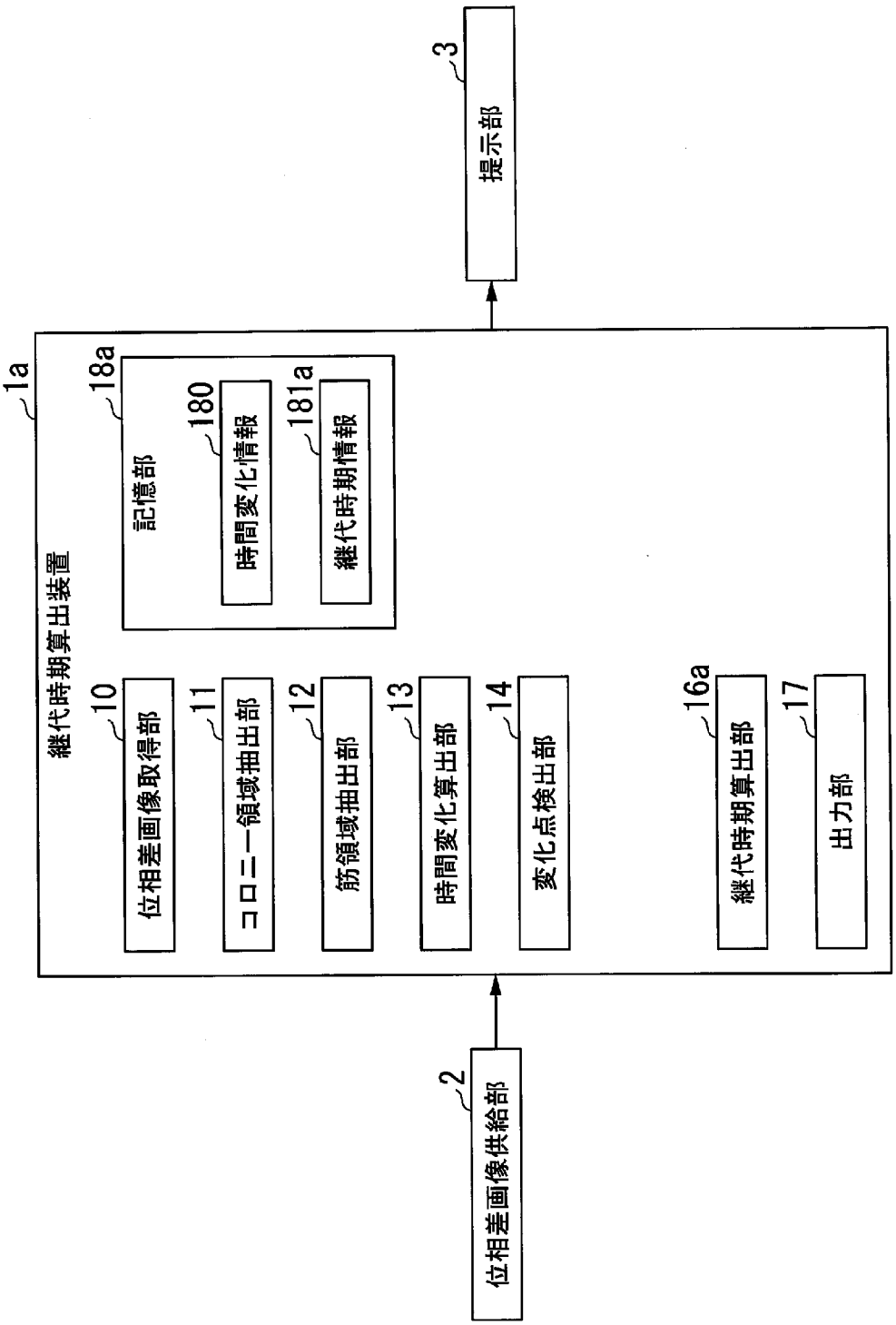
[図4]


G1
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
コロニー領域に筋領域が占める面積の割合
X1 (M1)
X2
TH
PT
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120 132 144 156 168 180 192
時間

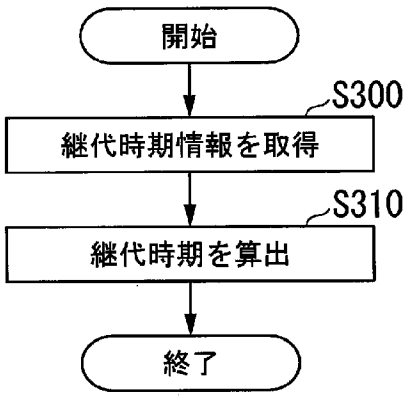
[図5]


開始
S200
減少率を算出
S210
継代時期を算出
終了

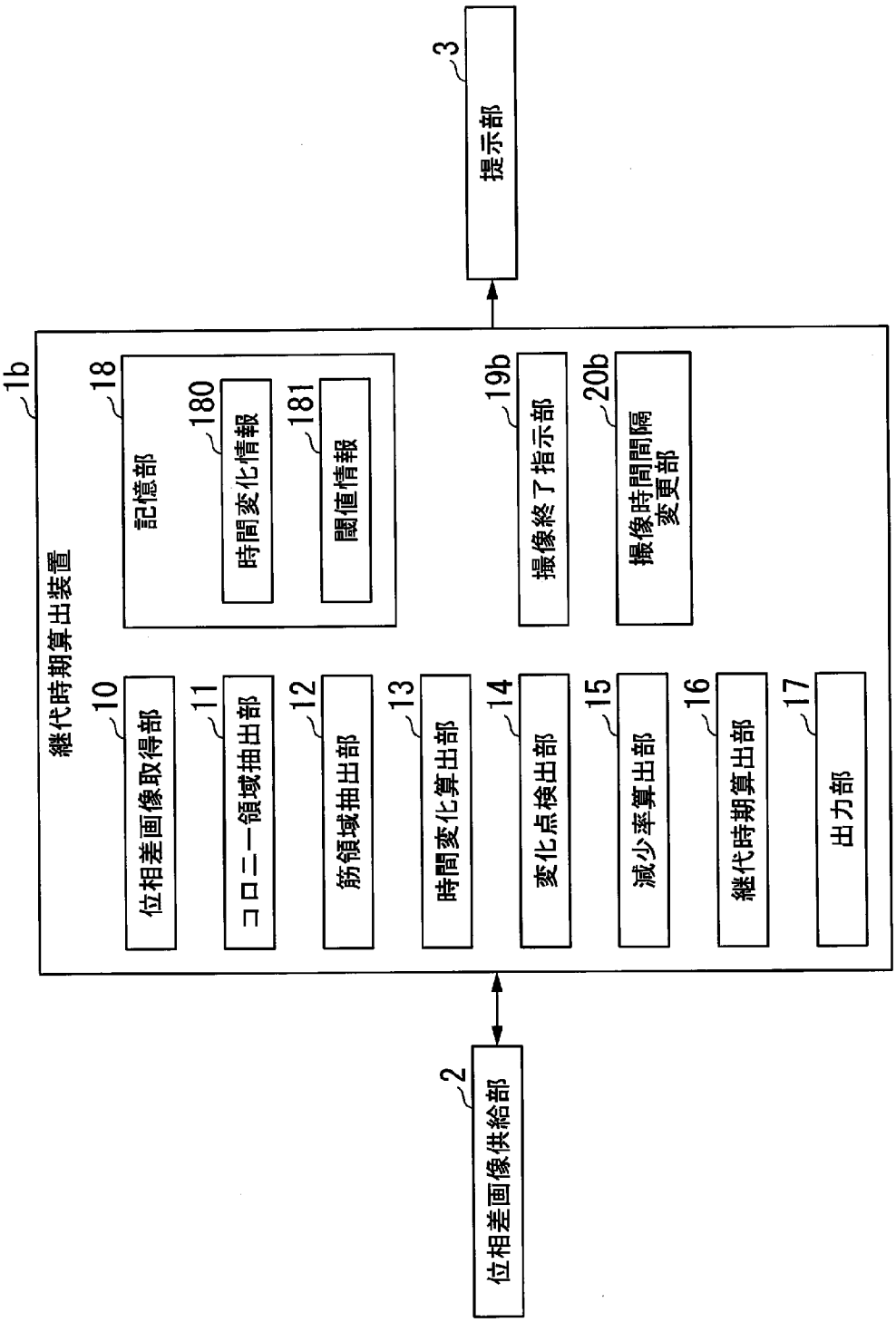
[図6]


1a
継代時期算出装置
18a
記憶部
180
時間変化情報
181a
継代時期情報
10
位相差画像取得部
11
コロニー領域抽出部
12
筋領域抽出部
13
時間変化算出部
14
変化点検出部
16a
継代時期算出部
17
出力部
2
位相差画像供給部
3
提示部

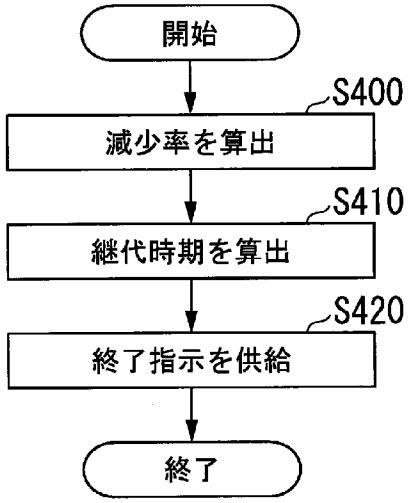
[図7]



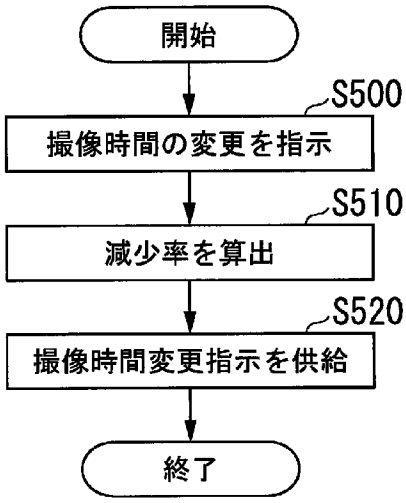
[図8]


3
提示部
1b
継代時期算出装置
18
記憶部
180
時間変化情報
181
閾値情報
19b
撮像終了指示部
20b
撮像時間間隔
変更部
10
位相差画像取得部
11
コロニー領域抽出部
12
筋領域抽出部
13
時間変化算出部
14
変化点検出部
15
減少率算出部
16
継代時期算出部
17
出力部
2
位相差画像供給部

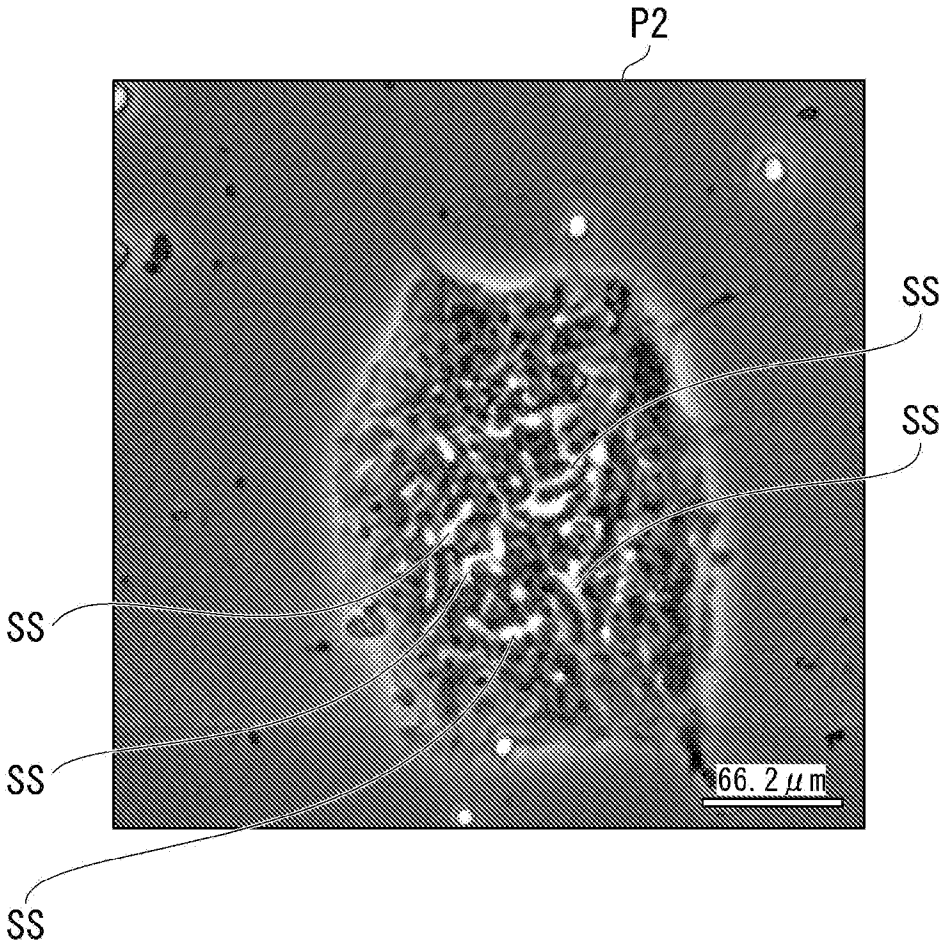
[図9]


開始
S400
減少率を算出
S410
継代時期を算出
S420
終了指示を供給
終了

[図10]


開始
S500
撮像時間の変更を指示
S510
減少率を算出
S520
撮像時間変更指示を供給
終了

[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/038926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. 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. C12M1/34

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), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/043077 A1 (KAWASAKI HEAVY INDUSTRIES, LTD.) 14 April 2011, claims 1, 3, paragraphs [0003], [0023], etc. & JP 2016-28607 A & US 2012/0315620 A1 & WO 2011/043077 A1 & EP 2487249 A1, claims 1, 3	1-7
A	WO 2012/115153 A1 (NIKON CORP.) 30 August 2012, claim 22, paragraphs [0009], [0030]-[0037], etc. (Family: none)	1-7

☒ 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
13 December 2019 (13.12.2019)	24 December 2019 (24.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/038926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/025508 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 26 February 2015, claim 1, paragraphs [0002], [0005], [0042], [0045], etc. & JP 2015-61516 A & US 2016/0163049 A, claim 1	1-7
A	WO 2011/010449 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 27 January 2011, entire text & US 2012/0114219 A1 & WO 2011/010449 A1 & EP 2457989 A1	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３８９２６

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

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

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), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
A	WO 2011/043077 A1 (川崎重工業株式会社) 2011.04.14, 請求項１、３、段落 0003, 0023 等 & JP 2016-28607 A & US 2012/0315620 A1 & WO 2011/043077 A1 & EP 2487249 A1 claim 1, 3	1-7
A	WO 2012/115153 A1 (株式会社ニコン) 2012.08.30, 請求項２２、段落 0009, 0030-0037 等 (ファミリーなし)	1-7

☑　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
１３．１２．２０１９	２４．１２．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４５０１
北村　悠美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2015/025508 A1 (富士フィルム株式会社) 2015.02.26, 請求項１、段落 0002, 0005, 0042, 0045 等 & JP 2015-61516 A & US 2016/0163049 A claim 1	1-7
A	WO 2011/010449 A1 (国立大学法人京都大学) 2011.01.27, 全文 & US 2012/0114219 A1 & WO 2011/010449 A1 & EP 2457989 A1	1-7