

(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201106010 A1

(43) 公開日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：099125264

(22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 30 日

(51) Int. Cl. : **G02B21/36 (2006.01)**

(30) 優先權：2009/08/07 日本 2009-184875

(71) 申請人：尼康股份有限公司 (日本) NIKON CORPORATION (JP)
日本

(72) 發明人：伊藤啟 ITO, KEI (JP) ; 三村正文 MIMURA, MASAFUMI (JP) ; 矢野和弘 YANO, KAZUHIRO (JP) ; 佐佐木秀貴 SASAKI, HIDEKI (JP)

(74) 代理人：陳傳岳；郭雨嵐

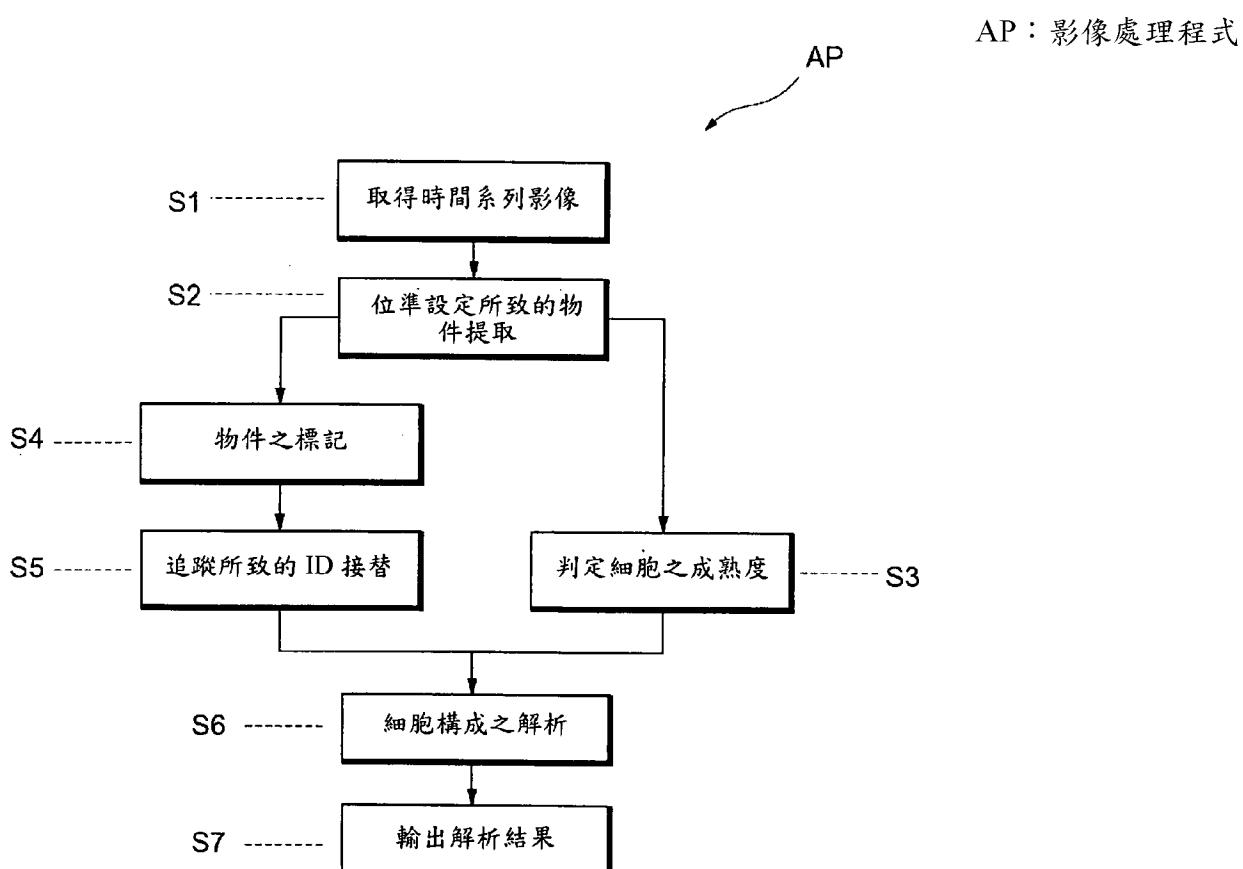
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：23 共 64 頁

(54) 名稱

細胞的分類手法、使用該手法的影像處理程式與影像處理裝置、以及細胞塊的製造方法

(57) 摘要

影像處理程式 AP 係在步驟 S1 讀出時間序列影像，在步驟 S2 進行各時刻之觀察影像中細胞的提取、標記、及細胞之一一對應，在步驟 S3 就於指定時刻 t_c 於觀察影像所含有之細胞，進行成熟度之判定處理。在步驟 S4 係就已判定成熟的細胞進行附 ID，在步驟 S5 中，使時間序列影像沿著時間軸在回溯方向或經時間方向，進行細胞追蹤所致 ID 接替。在步驟 S6 中，根據所接替的 ID 資訊進行各細胞之單一化數之計算、分類，並在步驟 S7 中輸出解析結果。



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201106010 A1

(43) 公開日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：099125264

(22) 申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 30 日

(51) Int. Cl. : **G02B21/36 (2006.01)**

(30) 優先權：2009/08/07 日本 2009-184875

(71) 申請人：尼康股份有限公司 (日本) NIKON CORPORATION (JP)
日本

(72) 發明人：伊藤啟 ITO, KEI (JP) ; 三村正文 MIMURA, MASAFUMI (JP) ; 矢野和弘 YANO, KAZUHIRO (JP) ; 佐佐木秀貴 SASAKI, HIDEKI (JP)

(74) 代理人：陳傳岳；郭雨嵐

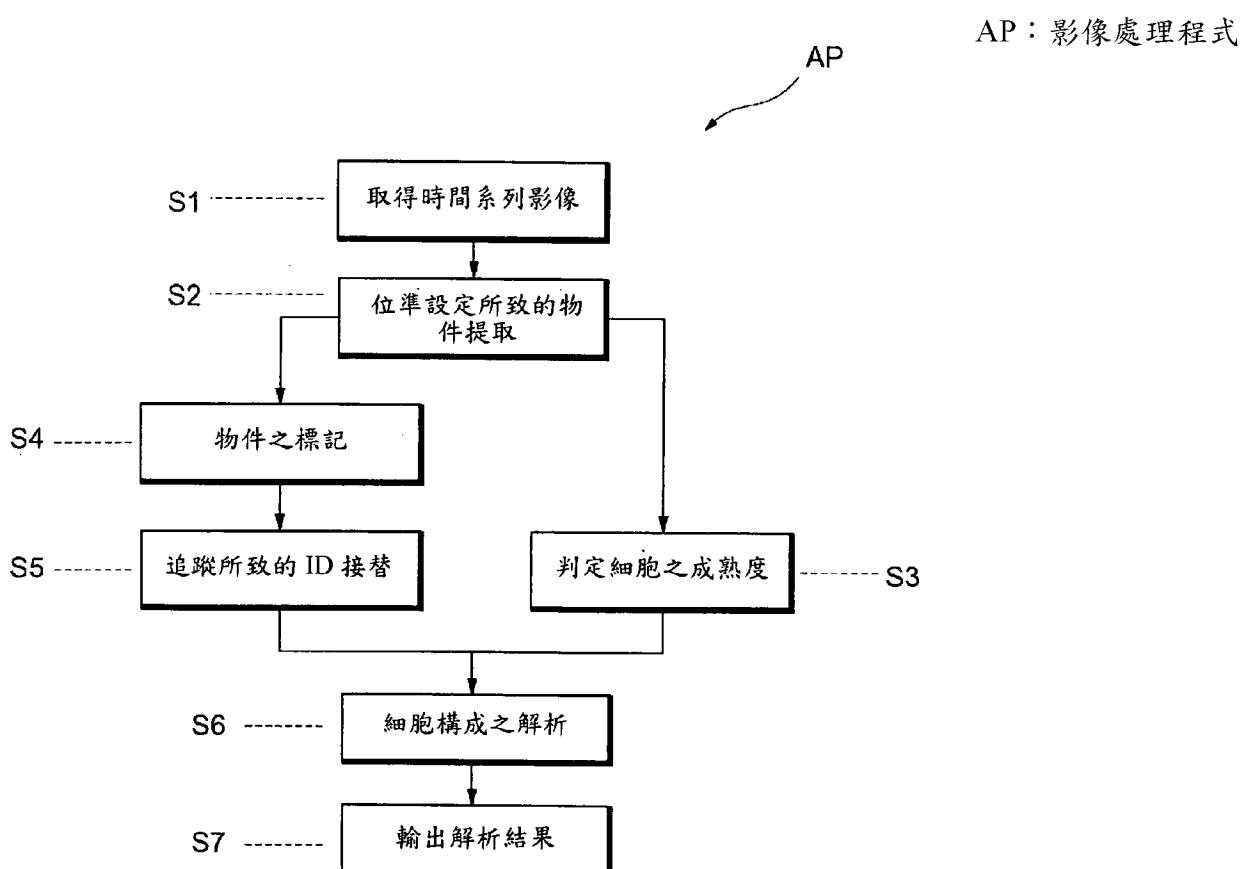
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：23 共 64 頁

(54) 名稱

細胞的分類手法、使用該手法的影像處理程式與影像處理裝置、以及細胞塊的製造方法

(57) 摘要

影像處理程式 AP 係在步驟 S1 讀出時間序列影像，在步驟 S2 進行各時刻之觀察影像中細胞的提取、標記、及細胞之一一對應，在步驟 S3 就於指定時刻 t_c 於觀察影像所含有之細胞，進行成熟度之判定處理。在步驟 S4 係就已判定成熟的細胞進行附 ID，在步驟 S5 中，使時間序列影像沿著時間軸在回溯方向或經時間方向，進行細胞追蹤所致 ID 接替。在步驟 S6 中，根據所接替的 ID 資訊進行各細胞之單一化數之計算、分類，並在步驟 S7 中輸出解析結果。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於自以細胞觀察所攝影之時間序列影像，進行細胞分類的細胞之分類手法。

【先前技術】

動植物之活細胞被利用於藥品之效能評價或培養環境之評價，作為試驗樣本則需多數個細胞。因此，吾人進行培養活細胞並予以增殖之細胞培養。在細胞培養中，由於在培養中亦含有滅絕之細胞，在 ES 細胞或 iPS 細胞若不以複數且某中程度之細胞塊開始培養時，則無法保持社會性而無法增殖等，故一般而言，係對 1 個培養基散布複數個細胞進行培養。作為一面培養細胞一面觀察之裝置之代表例則可舉培養顯微鏡。

培養顯微鏡具備形成適合於細胞培養之環境的培養裝置，與顯微觀察培養容器內細胞的顯微觀察系，其構成為可一面培養活細胞，一面觀察細胞之分裂或單一化、分化等之狀況(參照例如專利文獻 1)。在藉由細胞培養而育成之細胞(細胞塊)之挑選，係觀察者每隔一定時間進行顯微觀察，以細胞之觀察所致感官評價提取群體(colony)。

【先前技術文獻】

【專利文獻】

【專利文獻 1】日本特開 2004-229619 號公報

【發明內容】

【發明欲解決課題】

在藥品之效能評價或培養環境評價，為了提高評價精度吾人謀求可使試驗樣本之特性一致者(均質性)，理想是利用以單一細胞作為起源之培養細胞，但是，在習知之細胞培養，觀察者在顯微觀察時之細胞觀察所致感官評價係進行已成熟的細胞之提取，而就已成熟的細胞之起源(例如是幾個細胞單一化

所形成者)，則非為評價之對象。又，難以以充分頻率進行長期間持續的觀察，有極多的情況是觀察者在無法識別的觀察間隙中，群體彼此間完成單一化。因此本發明之課題是，即使可複數次提取已成熟的細胞之樣本，在每一樣本對藥效等產生差異之情形，則難以進行適當的評價。

本發明係鑒於前述課題而完成者，其目的在於提供一種可因應細胞之構成而予以挑選・評價的手段。

【解決課題之手段】

例示本發明之第一態樣係細胞之分類手法。該分類手法，係自在預設之時刻所攝影之第一影像提取影像所含有之細胞(稱為形態上一體之細胞，含有使複數個細胞單一化而呈一體的細胞塊，以下相同)，自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影之第二影像提取影像所含有之細胞，進行自第一影像所提取細胞與自第二影像所提取細胞之一一對應，在使第一影像之複數個細胞於第二影像成為一個之情形，則對已一體化的細胞賦予一體化前之細胞資訊，在使第一影像之一個之細胞於第二影像分離成複數個之情形，則對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊，就時間序列影像，使第一影像及第二影像沿著時間軸依順序偏移同時實行細胞之提取及一一對應，依順序接替影像中所含有之各細胞之細胞資訊，就任意時刻所攝影之影像所含有之細胞，根據該接替的細胞資訊，進行細胞之分類。

例示本發明之第二態樣，係以電腦可資讀取，在作為取得以成像裝置所攝影之影像而進行影像處理之影像處理裝置，用以使電腦發揮作用之影像處理程式。該影像處理程式係取得以成像裝置在預設之時刻所攝影之第一影像，提取影像所含有之細胞之第一步驟；取得以成像裝置於該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影的第二影像，提取影像所含有之細胞之第二之步驟；進行自該第一影像所提取的細胞與自該第二影像所提取的細胞之一一對應，在該第一影像之複數個細胞在該第二影像成為一個之情形，對一體化細胞賦予一體化前之細胞資訊，該第

一影像之一個之細胞在該第二影像分離成複數個之情形，對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊之第三步驟；就時間序列影像沿著時間軸依順序偏移同時實行該第一至第三之步驟依順序接替影像中所含有之各細胞之該細胞資訊之步驟；就所指定之時刻所攝影之影像所含有之細胞，輸出該接替的細胞資訊之步驟而構成。此外，該影像處理程式，較佳的構成係進一步包含：根據該接替的細胞資訊，將該指定的時刻所攝影之影像所含有之細胞予以分類之步驟；輸出分類結果之步驟。

例示本發明之第三態樣，係一種影像處理裝置，其具備：取得以成像裝置間隔預設之時間攝影細胞的時間序列影像，並解析影像之影像解析部；輸出影像解析部所致解析結果之輸出部。在該影像處理裝置中，影像解析部係自預設之時刻所攝影之第一影像提取影像所含有之細胞，自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影的第二影像提取影像所含有之細胞，進行自第一影像所提取細胞與自第二影像所提取之細胞之一一對應，在第一影像之複數個細胞於第二影像成為一個之情形，則對已一體化的細胞賦予一體化前之細胞資訊，在第一影像之一個細胞於第二影像分離成複數個之情形，對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊，就時間序列影像，使第一影像及第二影像沿著時間軸依順序偏移同時實行細胞之提取及一一對應，依順序接替影像中所含有之各細胞之細胞資訊，輸出部之構成係就所指定時刻所攝影之影像所含有之細胞，輸出該接替的細胞資訊。在該影像處理裝置中，其構成較佳為影像解析部，係根據該接替的細胞資訊，分類該指定時刻所攝影之影像所含有之細胞，而輸出部係輸出影像解析部所致分類結果。

在例示前述第一至第三態樣的本發明中，攝影第一影像的該預設之時刻為時刻 t 、攝影第二影像的時刻係自該預設之時刻至預設之時間前之時刻 $t-1$ ，使細胞資訊之接替係沿著時間序列影像之時間軸，在回溯時間至觀察開始時期為止之方向實行，就該任意時刻所攝影之影像中之細胞，根據回溯至觀察開

始時期為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

又，使攝影第一影像的該預設之時刻為時刻 t ，攝影第二影像之時刻係自該預設之時刻至預設之時間後之時刻 $t+1$ ，而細胞資訊之接替係沿著時間序列影像之時間軸，自觀察開始時期至時間之經過方向實行，就該任意時刻所攝影之觀察影像所含有之細胞，根據至該時刻為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

【發明效果】

在本發明之細胞之分類手法，於影像處理程式及影像處理裝置中，使第一、第二影像沿著時間軸依順序偏移，同時進行細胞之提取及一一對應，使細胞之單一化或分離依順序接替作為各細胞之細胞資訊，根據所接替的細胞資訊進行細胞之分類。因此，根據本發明，培養細胞之構成極為明確，係提供一種可進行細胞之挑選・評價之手段。

此外，根據細胞資訊之接替係沿著時間序列影像之時間軸，在回溯時間至觀察開始時期為止之方向實行之方法，由於可減低在開始追蹤之際之細胞數，故可減低演算處理之處理負擔使高速處理為可行。一方面，根據細胞資訊之接替係沿著時間序列影像之時間軸，自觀察開始時期至時間之經過方向實行之方法，在細胞培養之觀察中，則可即時掌握目前各細胞之起源細胞數等。

【實施方式】

茲就本發明實施方式，一面參照圖示一面說明如下。作為適用本發明影像處理裝置的系統之一例，在第二圖及第三圖表示培養觀察系統之概要構成圖及方塊圖，首先就培養觀察系統 BS 之全體構成予以概要說明。

培養觀察系統 BS，大致區分係由：設置於外殼 1 上部的培養室 2；收容、保持複數個培養容器 10 的存放架 3；觀察培

養容器 10 內試料的觀察單元 5；搬送培養容器 10 之搬送單元 4；控制系統運作的控制單元 6；及具備影像顯示裝置的操作盤 7 等所構成。

培養室 2 係形成培養環境的房間，隨付著該培養室 2 有設置溫度調整裝置 21、加濕器 22、供給 CO₂ 氣體或 N₂ 氣體等氣體的氣體供給裝置 23、循環風扇 24、檢測培養室 2 的溫度或濕度等之環境感測器 25 等。存放架(stocker)3 係在形成分隔為前後及上下之棚架狀的各棚架上設定固有之號碼牌。培養容器 10 可按照培養之細胞類別或目的而適宜選擇，例如在皿型之培養容器中，使細胞試料與液體培養基一起注入、保持。在各培養容器 10 中賦予編碼序號，以一一對應於存放架 3 之指定號碼牌之方式收容。搬送單元 4 係由：設置於培養室 2 內部，可上下移動的 Z 台(stage)41；可前後移動的 Y 台 42；可左右移動的 X 台 43 等所構成，在 X 台 43 之前端側設有可舉起培養容器 10 並支持的支持臂 45。

觀察單元 5 係由：自試料台 15 之下側照明試料的第一照明部 51；沿著顯微觀察系 55 之光軸，自上方照明試料的第二照明部 52 及自下方照明試料的第三照明部 53；進行試料之巨觀觀察之巨觀觀察系 54；進行試料之微觀觀察的顯微觀察系 55；及影像處理裝置 100 等所構成。在試料台 15，於顯微觀察系 55 之觀察區域設置有透明的窗部 16。

巨觀觀察系 54 之構成係具有：觀察光學系 54a；攝影以觀察光學系所成像試料之像之 CCD 照相機等之成像裝置 54c，並取得自以第一照明部 51 所背光照明的培養容器 10 上方的全體觀察影像(巨觀像)。顯微觀察系 55 之構成係具有：由對物透鏡或中間變倍透鏡，螢光過濾器等所構成觀察光學系 55a；攝影以觀察光學系 55a 所成像試料之像的冷卻 CCD 照相機等之成像裝置 55c。對物透鏡及中間變倍透鏡係構成為：藉由各自設置複數個，並改變透鏡之組合而可設定任意之觀察倍率。在顯微觀察系 55 中，可取得被第二照明部 52 所照明之細

胞之透過像、被第三照明部 53 所照明之細胞之反射像、被第三照明部 53 所照明之細胞之螢光像等之使培養容器 10 內細胞經顯微鏡觀察的顯微觀察像(微觀像)。

影像處理裝置 100 係以巨觀觀察系 54 之成像裝置 54c、顯微觀察系 55 之成像裝置 55c 所攝影，處理自該等成像裝置所輸入之信號，而產生全體觀察影像或顯微觀察影像等之影像。又，影像處理裝置 100 係對該等觀察影像(影像數據)實施影像解析、慢速(time lapse)影像之產生、細胞運動狀態的解析、細胞成熟度解析、細胞構成解析等。此外，關於影像處理裝置 100 則詳如後述。

控制單元 6 具有：實行處理的 CPU61；設定、記憶培養觀察系統 BS 之控制程式或控制數據等的 ROM62；暫時記憶含有硬碟或 DVD 等輔助記憶裝置的觀察條件或影像數據等的 RAM63 等，並控制培養觀察系統 BS 之運作。因此，如第三圖所示，係使培養室 2、搬送單元 4、觀察單元 5、操作盤 7 之各構成機器與控制單元 6 連接。在 RAM63 中，係設定、記憶按照觀察程式之培養室 2 之環境條件，或觀察排程、觀察單元 5 中的觀察類別或觀察位置、觀察倍率等。又，在 RAM63 中，係設置記錄以觀察單元 5 所攝影之影像數據的影像數據記憶區域，並以一一對應於培養容器 10 之含有編碼序號或攝影日時等的索引・數據與影像數據之方式，加以記錄。

在操作盤 7 設置：設有鍵盤或鍵(switch)等輸出入機器的操作面板 71，顯示操作畫面或觀察影像、解析結果等的顯示面板 72，在操作面板 71 中，進行觀察程式之設定或條件選擇，動作指令等之輸入。通信部 65 係準照有線或無線之通信規格而構成，在該通信部 65 與外部連接之電腦等之間，可進行控制信號或觀察數據之傳送、接收。

如此概要構成的培養觀察系統 BS，係依照操作盤 7 中所設定的觀察程式，來控制 CPU61 各部分之運作，且自動地實行培養容器 10 內試料之攝影。觀察程式一啟動，CPU61 則根

據記憶於 RAM63 的環境條件來控制溫度調整裝置 21、加濕器 22 等運作，並控制培養室 2 之環境。又，讀取記憶於 RAM63 的觀察條件，根據觀察排程，啟動 X、Y、Z 台 43、42、41，自存放架 3 搬送觀察對象之培養容器 10 於試料台 15，並開始進行觀察單元 5 所致觀察。例如，在觀察程式中所設定之觀察係細胞之微觀觀察之情形，則將該培養容器 10 定位於顯微觀察系 55 之光軸上，使第二照明部 52 或第三照明部 53 之光源開燈，在成像裝置 55c 上攝影顯微觀察像。

在以上方式構成的培養觀察系統 BS 中，影像處理裝置 100 係具有下列功能：間隔預設之時間，取得以成像裝置(54c、55c)所攝影的培養細胞影像，解析取得的影像，輸出對所培養的細胞之挑選・評價極為有用的資訊(細胞之構成資訊或分類資訊)的功能。該功能可適當地利用於 iPS 細胞或 ES 細胞等之解析。

該功能係利用時間序列影像中細胞之追蹤而進行，在鄰接之影像間產生細胞之單一化或分割時，將單一化或分割前細胞之資訊(細胞資訊)賦予單一化或分割後之細胞，依順序在沿著時間序列影像之時間軸之經時間方向或回溯時間方向偏移並實行，進行細胞資訊之接替，就任意時刻之影像中細胞，則可藉由：輸出顯示所接替的細胞資訊，或者根據所接替的細胞資訊顯示分類結果而予實現。

例如，在時刻 t 之觀察影像(第一影像)中為二個之細胞 $c1, c2$ ，在次時刻 $t+1$ 之觀察影像(第二影像)成為一個之情形，對已一體化之細胞賦予一體化前之細胞資訊 $c1, c2$ ，使其依順序在沿著時間序列影像之時間軸之經時間方向偏移並實行，進行細胞資訊之接替，例如就時刻 $t+x$ 之觀察影像中之細胞，則輸出顯示該細胞為在時刻 t 中由 3 個細胞 $c1, c2, c5$ 所構成。

在此，藉由使時刻 t 為觀察開始時之 $t=0$ ，即可得知在時刻 $t+x$ 之觀察影像中各細胞係由幾個之何種起源細胞所構成，或是否存在由單一細胞所構成之群體。再者，藉由使時刻 $t+x$ 在目前(最新之觀察時)持續觀察，即可以即時獲得前述真知灼

見，掌握成長之細胞塊之起源或構成，而可準確地進行細胞之評價・挑選。

又，例如在時刻 t 之觀察影像(第一影像)中為一個的細胞 C_1 ，在前時刻 $t-1$ 之觀察影像(第二影像)成為二個之情形，已分離的二個細胞各自賦予分離前之細胞資訊 C_{11} 、 C_{12} ，使其依順序在沿著時間序列影像之時間軸之回溯時間方向偏移並實行，進行細胞資訊之接替，例如在時刻 $t-x$ 之觀察影像中輸出顯示於時刻 t 有成為一個細胞 C_1 的細胞 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 。

此時，藉由使時刻 $t-x$ 成為觀察開始時之 $t=0$ ，即可得知在時刻 t 成為成長的細胞塊之細胞，在觀察開始時係由幾個之何種細胞所構成，或是否存在由單一細胞所構成群體(colony)之細胞，藉由使時刻 t 作為目前(最新之觀察時)，即可掌握培養中細胞塊之起源或構成，準確地進行細胞之評價・挑選。

此種根據細胞資訊的細胞分類，就觀察期間內所指定之時刻之觀察影像所含有之細胞塊，可例示例如，按照構成細胞塊的細胞個數以色彩區別表示觀察影像中之細胞塊，或者，以色彩區別表示含有特定之起源細胞的細胞塊等之分類形態。又，可例示僅就後述之細胞塊之成熟度判定的組合，判定為已成熟的細胞塊，進行前述色彩區別顯示，或者，與前述色彩區別顯示不同，以框圍繞已判定成熟的細胞塊予以顯示等之分類形態。又，就觀察影像中所含有之細胞塊，以構成細胞數予以分類的組織圖(histogram)方式予以輸出顯示，從掌握所培養的細胞之全體像之觀點言之亦為有效。

使用到前述手法的時間序列影像之解析處理可在影像處理裝置 100 中實行。第四圖表示影像處理裝置 100 之概要方塊圖，在影像處理裝置 100 中所實行之影像處理程式 GP 中，在回溯時間軸之方向解析時間序列影像之情形之影像處理程式 GP1 之流程圖係如第五圖所示。

影像處理裝置 100 係藉由將設定、記憶於 ROM62 的影像處理程式 GP(GP1、GP2)被 CPU61 所讀取，根據藉由 CPU61

之影像處理程式 GP 之處理依順序實行而構成。換言之，影像處理程式 GP 級將為硬體資源的 CPU61(電腦)作為影像處理裝置 100 而發揮作用之軟體。

影像解析部 120 級根據影像處理程式 GP，以成像裝置(在說明書中則作為微觀系之成像裝置 55c)攝影，並將記錄於 RAM63 的時間序列之觀察影像以如下述方式進行影像處理。

(I)回溯時間軸之追蹤所致的發生起源細胞數之計算方法

藉由對操作面板 71 之操作輸入等而啟動影像處理程式 GP1 時，影像解析部 120，首先係在步驟 S11 中，自記憶於 RAM63 的時間序列影像，在以觀察者指定的時刻 $t=t_c$ (例如最新之觀察時機)所攝影之第一影像、與其之前之時刻 $t=t_c-1$ 所攝影之第二影像予以讀出而取得，在步驟 S12 中提取各影像所含有之細胞。在自觀察影像(影像數據)之細胞之提取，可使用 Snakes 或位準設定等之動態輪廓法或分散過濾器。

在其次之步驟 S14 中，相對於在第一影像中所提取之細胞，進行標記(附 ID)。例如，記憶於 RAM63 的時刻 $t=0,1,\dots,t_c-1,t_c$ 之間之時間序列影像係如第六圖之示意圖所示，在時刻 $t=t_c$ 之第一影像所含有之各細胞，賦予如 C1、C2、C3、…、C6 般之 ID(識別號碼)。

接著，在步驟 S15，於第一影像與第二影像之間，取得影像所含有細胞之對應，進行追蹤所致的細胞資訊之接替。此時，第一影像之複數個細胞在第二影像成為一個之情形，在已一體化之細胞接替一體化前之細胞資訊，在第一影像之一個細胞於第二影像分離成複數個之情形，在已分離的各細胞接替分離前之細胞資訊。

細胞資訊之接替係由在第一影像存在細胞之區域、與在第二影像存在細胞之區域之重疊來判斷，且在即使一部分重疊 (overlap even partially)之細胞接替第一影像之細胞資訊。觀察影像之攝影間隔，一般而言，相對於細胞之移動速度係設定為充分的小，在追蹤係使用到光學流(optical flow)的追蹤、卡爾

曼過濾器(kalman filter)等之線性預估(linear prediction)方法。此外，觀察間隔並非充分，在第一影像與第二影像細胞區域無重疊之情形，可使用與 1 資訊框前之細胞之距離與相關值所致的追蹤，或卡爾曼過濾器等之線性預估，擴張卡爾曼過濾器或微粒過濾器(partiCle filter)等之非線形移動預測方法進行追蹤。

如第六圖所示，時刻 $t=t_c$ 之第一影像之細胞 C2 於時刻 $t=t_c-1$ 之第二影像分離為二之情形(隨著時間二個細胞經單一化的情形)，作為細胞資訊係使細胞 C2 之 ID 被接替，可賦予各細胞如 C_{21} ， C_{22} 般之 ID。同樣地，第一影像之細胞 C5 被第二影像分為三個，在此情形，於第二影像之各細胞被賦予接替細胞 C5 的 ID 之 C_{51} 、 C_{52} 、 C_{53} 之 ID 作為細胞資訊。

後續係就時間序列影像，使第一影像與第二影像沿著時間軸在回溯方向，依順序偏移並實行前述步驟 S11 至 S15，將影像中所含有各細胞之細胞資訊依順序接替至時刻 $t=0$ 為止。亦即，其次之細胞資訊接替處理，係使在時刻 $t=t_c-1$ 所取得的觀察影像作為第一影像，在時刻 $t=t_c-2$ 所取得的觀察影像作為第二影像進行細胞之追蹤，在已經接替細胞資訊之時刻 t_c-1 之細胞與區域為即使有一部分重疊之時刻 t_c-2 之細胞接替細胞資訊。

重複該細胞資訊之接替處理，直到第二影像成為時刻 $t=0$ 之觀察影像，並導出時刻 $t=0$ 中細胞資訊。在步驟 S16，係根據所接替的細胞資訊，在散佈細胞之時刻 $t=0$ ，計數具有相同細胞資訊的細胞數，進行在時刻 t_c 中成為一體的細胞之發生起源細胞與構成細胞數之計算、分類等，在步驟 S17 中解析結果係自輸出部 130 輸出至顯示面板 72 等。

在第六圖係表示，將接替的細胞資訊交付各時刻之觀察影像中之各細胞而顯示的輸出例；與整理所接替的細胞資訊，並分類顯示在時刻 t_c 中構成細胞 C1 至 C6 的發生起源細胞的輸出例(圖中右上部之分類圖)。

在將細胞資訊交付觀察影像中之各細胞而顯示之前者之

輸出例中，例如在時刻 t_c 將成為細胞 C5 的細胞 C_{5_1} 、 $C_{5_{21}}$ 、 $C_{5_{22}}$ 、 C_{5_3} 以相同色彩表示，在時刻 t_c 將成為細胞 C4 的細胞 C_{4_1} 、 C_{4_2} 以其它相同色彩表示等，若在時刻 t_c 以成為細胞 C1 至 C6 的細胞群之每一群予以分類顯示時，則可使細胞構成之掌握更加容易化。又，就後者之輸出例，細胞 C1 至 C6 之發生起源細胞之分類顯示與時刻 t_c 之觀察影像一起，可構成為顯示於其側方(lateral)等，或者亦可構成為按照發生起源細胞之數目(1 個至 n 個)以色彩區別表示細胞 C1 至 C6，根據此種輸出表示，可進一步使細胞構成之掌握容易化。

藉由此種細胞資訊之顯示，根據細胞資訊的發生起源細胞之分類顯示等，因而觀察者可明確得知，在時刻 t_c 成為已成熟的細胞塊之細胞 C1 係由單一細胞所構成之群體，或者在時刻 t_c 之觀察影像中，所見到同樣地已成熟的細胞塊之細胞 C2、C4、C5 係各自由 3 個、2 個、4 個之發生起源細胞所構成等。

此外，以上係例示就時刻 t_c 之觀察影像所含之全細胞進行追蹤，並輸出全細胞之細胞資訊或細胞分類之構成，不過亦可構成為自時刻 t_c 之觀察影像選擇解析對象並實行處理。例如，以滑鼠等指定自觀察影像全體實行解析的區域部分，或者以滑鼠等選擇指定自觀察影像成長的細胞(例如第六圖中細胞 C1、C2、C4、C5)，或亦可構成為利用詳述於後的細胞之成熟判定手法，自動選擇成熟細胞，實行解析處理。藉此，可將非有解析必要的未成熟細胞等除外，減輕處理負擔，就所期望之細胞以高速實行起源資訊之解析。

(II)追蹤時間軸之追蹤所致的發生起源細胞數之計算方法

接著，關於自觀察初期在時間軸之經時間方向進行追蹤之發生起源細胞數之計算方法加以說明。該方法之影像處理程式 GP2，係與第五圖所示影像處理程式 GP1 之流程圖與基本構成為相同，將第五圖中「時刻 t_c 之輸入影像」替換為「時刻 $t=0$ 之輸入影像」、「時刻 t_c-1 之輸入影像」替換為「時刻 $t=1$ 之輸入影像」、…、「時刻 $t=0$ 之輸入影像」替換為「時刻 t_c 之輸入

影像」，藉由追蹤時間軸之經過方向而可實現。

一方面，在第五圖中，就相當於步驟 S15 之追蹤所致的 ID 接替(細胞資訊之接替)，與前文所述影像處理程式 GP1 不同之構成係例示於下，在適用該 ID 接替於影像處理程式 GP2 之情形之詳細流程圖係如第七圖所示。在該圖中，在進行與影像處理程式 GPI 同樣之處理的步驟中提供相同步驟號碼表示。

藉由對操作面板 71 之操作輸入等而啟動影像處理程式 GP2 時，影像解析部 120，首先在步驟 S11 中，自記憶於 RAM63 的時間序列影像，讀出並取得時刻 $t=0$ (以觀察者指定有初期時刻之情形則為該觀察時機)所攝影之第一影像、與在該次時刻 $t=1$ 所攝影之第二影像，在步驟 S12 中提取各影像所含有之細胞。

在其次之步驟 S14 中，相對於第一影像中所提取之細胞，進行標記(附 ID)。例如，記憶於 RAM63 的時刻 $t=0,1,\dots,t_c-1,t_c$ 之時間序列影像係如第八圖之示意圖所示，在時刻 $t=0$ 之第一影像所含有之各細胞賦予如 c_1,c_2,c_3,\dots,c_{12} 般之 ID。

接著，在步驟 S15 中，於第一影像與第二影像之間，取得影像所含有之細胞之對應，進行追蹤所致的細胞資訊(ID)之接替。該追蹤所致的 ID 接替，可以第七圖所示步驟 S151 至 S155 來實行。

在步驟 S151 係進行追蹤處理，即使在第一影像存在細胞的區域，與在第二影像存在細胞的區域為即使有一部分重疊的細胞也是一一對應作為同一細胞。如前文所述，觀察影像之攝影間隔相對於細胞之移動速度係設定為充分的小，可藉由觀察細胞區域之重複，進行細胞之一一對應。又，在第一影像與第二影像不致使細胞區域重疊之情形，可使用與 1 資訊框前之細胞之距離與相關值所致的追蹤，或卡爾曼過濾器等之線性預估、擴張卡爾曼過濾器或微粒過濾器等之非線形移動預估方法，進行追蹤。

在步驟 S152 係判斷第一影像之二個以上細胞是否對應於

第二影像之一個細胞，在判斷第一影像之二個以上細胞對應於第二影像之一個細胞(二個以上細胞經一體化)之情形，則進行至步驟 S153，在非對應於第二影像之一個細胞之情形則進行至步驟 S155b。在步驟 S153，則進行按照第一影像之二個以上 ID 之對應數的單一化數之總計，在步驟 S155a 中第一影像之細胞之任一 ID，例如將最新的(最小)ID 賦予第二影像之細胞並接替細胞資訊。一方面，在步驟 S152 中判斷細胞無單一化之情形，亦即，第一影像之細胞與第二影像之細胞係以 1：1 對應時，或者第一影像之一個之細胞以第二影像分離成二個以上細胞時，在步驟 S155b 中第一影像之細胞之 ID 則照樣被接替。

例如，如第八圖所示，時刻 $t=0$ 之第一影像之細胞 c2 與 c3，在以時刻 $t=1$ 之第二影像一體化成一個細胞之情形，在第二影像之已一體化之細胞，於二個 ID 號碼中新的號碼之 c2 與細胞之單一化數 $s=2$ 係進行接替作為細胞資訊。同樣地第一影像之細胞 c9 與 c10 係以第二影像進行一體化，在該情形，在第二影像之已一體化之細胞，ID 號碼 c9 與細胞單一化數 $s=2$ 係進行接替作為細胞資訊。

後續，係就時間序列影像，使第一影像與第二影像沿著時間軸在經時間方向依順序偏移同時實行前述步驟 S11 至 S15，將影像中所含有之各細胞之細胞資訊依順序接替至指定時刻(例如現在時刻中最新之觀察時機) $t=t_c$ 。亦即，其次之細胞資訊接替處理，係使在時刻 $t=1$ 取得的觀察影像作為第一影像，使在時刻 $t=2$ 取得的觀察影像作為第二影像，進行細胞之追蹤，將已經接替細胞資訊的時刻 $t=1$ 之細胞與即使區域有一部分重疊時刻 $t=2$ 之細胞，接替細胞資訊。

將該細胞資訊之接替處理重複進行直至第二影像成為時刻 $t=t_c$ 之觀察影像為止，並導出時刻 t_c 中細胞資訊。在步驟 S16(參照第五圖)，根據接替的細胞資訊，進行時刻 t_c 之觀察影像中細胞之發生起源細胞與構成細胞數之計算、分類，在步

驟 S17 中自輸出部輸出於顯示面板 72 等。

在第八圖係表示，將接替的細胞資訊交付各時刻之觀察影像中之各細胞並予顯示的輸出例，與整理接替的細胞資訊，就時刻 t_c 之觀察影像中細胞 c1、c2、c4、c5、c9、c12，分類顯示發生起源之細胞數的輸出例(圖中右下部之分類圖)。在將細胞資訊交付觀察影像中之各細胞並顯示的輸出例中，接替的細胞資訊之單一化數 $s(s=1$ 至 $n)$ ，亦即藉由構成為按照形成時刻 t_c 之各細胞的發生起源細胞之數，以色彩區別顯示細胞 c1、c2、c4、c5、c9、c12，即可更容易掌握各細胞之構成。

接著，藉由此種細胞資訊之顯示，根據細胞資訊的發生起源細胞之分類顯示等，則觀察者可明確得知，在時刻 t_c 成為成熟的細胞塊之細胞 c1 為由單一細胞所構成之群體，或在時刻 t_c 之觀察影像，同樣地可見到成熟的細胞塊之細胞 c2、c5、c9 係各自由 3 個、2 個、4 個之發生起源細胞所構成等。又，根據本方法，使時刻 t_c 作為最新之觀察時機，藉由觀察影像每一次攝影予以依順序更新，持續解析，即可掌握目前所觀察之細胞之發生起源或構成細胞數，可即時且準確地進行培養中細胞之評價・挑選。

以上係例示就時刻 $t=0$ 之觀察影像所含有之全細胞進行追蹤，並輸出全細胞之細胞資訊或細胞分類的構成，不過亦可構成為自時刻 $t=0,1,2$ 等初期之觀察影像選擇解析對象並實行處理。例如以滑鼠等指定自觀察影像全體實行解析的區域部分，或者亦可構成為，將在初期階段幾乎無觀察到成長的細胞 c4、c12 等除外，並選擇指定其它細胞，或利用次述的細胞之成熟判定手法，自動選擇成熟細胞，實行解析處理。藉此，可將無解析必要的未成熟細胞等除外，減輕處理負擔，就所期望之細胞以高速實行起源資訊之解析。

接著，就以上說明的細胞資訊之顯示・發生起源細胞之分類顯示，在指定時刻中自動選擇充分成熟的細胞並予解析處理之情形所使用之細胞之成熟判定手法加以說明。此外，在以下

為了表現細胞之成長狀態，則適宜使用細胞塊之語句。

培養細胞在培養基內向平面擴展的平面培養中，在 iPS 細胞或 ES 細胞等之細胞成長成具有社會性之細胞塊之過程中開始複層化，複層化擴展至細胞塊全區域並漸成熟。因此，藉由依順序計算自時間序列影像在各時刻或時刻間關於細胞之複層化之特徵量(以下稱為複層化特徵量)，並採用該複層化特徵量之時間的變化即可判斷細胞之成熟度(成熟狀態)。

在本說明書中，作為關於細胞之複層化之複層化特徵量有提示：(1)根據觀察影像間局部區域之區塊比對所致近似度的統計量、(2)根據細胞塊之輪廓附近之亮度值的統計量、(3)根據細胞塊之輪廓形狀的統計量。

(1)利用影像間局部區域之區塊比對所致近似度之方法

該手法係就預設之時間中所攝影的時間序列影像中時刻 t 之觀察影像(第一影像)；次時刻 $t+1$ 之觀察影像(第二影像)，以第一影像中細胞之局部區域之亮度分布做為樣板，就含有第二影像之細胞之對應位置的近旁部，進行亮度分布之區塊比對，將所計算匹配度最高的位置區域(區域內亮度分布之變化最少的位置區域)之近似度作為該位置區域之代表近似度，根據該代表近似度使統計量作為複層化特徵量。

此係利用細胞不予以複層化的單層區域之部位、與已複層化部位之影像具有以下特徵者。一個細胞在成長或複數細胞匯集而向水平方向擴展的單層細胞塊，在鄰接之時刻之影像間，即使產生各個細胞之移動或旋轉，亦可觀察細胞彼此間之境界，而可保持細胞內部構造。一方面，在細胞被複層化之情形，在細胞塊內部由於變化是朝上下方向進行分裂或移動而起泡，故影像之空間的構造或明亮度大幅改變。

如此一來，在單層區域，由於細胞塊內部之變化係以空間的移動作為主體，故在含有 2 影像之對應位置的周邊進行區塊比對時，匹配之程度變高，相對於此，在複層化區域中，在細胞內部之變化不僅是空間的移動，而且伴隨構造的變化，故即

使進行周邊探索，匹配之程度亦低。可利用相關值或差分值、乘法值等作為近似度之指標，例如在使用到相關值之情形，在單層區域中代表近似度高，而在複層化區域則代表近似度變低，藉由代表近似度之大小，而可判斷複層化之狀態。在影像間局部區域之區塊比對係在影像處理裝置 100 中實行。本方法之影像處理程式 GP 中進行複層化部位之檢測處理之部分 SP1 之流程圖係如第九圖所示。

影像解析部 120 係首先在步驟 S31 中，自記憶於 RAM63 的時間系列影像取得時刻 t 之第一影像(例如第十(a)圖所示細胞觀察影像)；與次時刻 $t+1$ 之第二影像(例如第十圖(b)所示細胞觀察影像)，在步驟 S32 中，藉由與影像處理程式 GP1、GP2 中說明的相同方法，進行觀察影像中所含有細胞之提取、標記、及第一影像之細胞與第二影像細胞之一一對應。此時，為了減小在影像間之細胞之旋轉或移動所致效果，故進行各細胞之位置對準。位置對準係以各細胞之重心位置或外接矩形之頂點位置等為基準進行。藉由使角度一致而使圖形力矩之相關呈最大(差分值最小)，即可抑制旋轉之效果。

接著，在步驟 S33 中，就第一影像之細胞，設定以形成影像之像素作為中心的局部區域 A。「局部區域」A 係如第十一(a)圖以白色黑底之框包圍之表示，設定為相較於細胞塊之大小更充分的小，例如係設定於 5×5 至 15×15 像素左右(起源細胞二至三個左右之大小)。局部區域之位置，其之構成係例如以所提取的細胞之輪廓端部作為起點加以自動設定而構成。

關於如此所設定之局部區域，在步驟 S34 中係進行區塊比對。區塊比對係在第一影像中如第十一(a)圖所設定的局部區域 A 之亮度分布作為基準，如第十一(b)圖所示，相對於第二影像中含有對應位置區域之周邊，掃描局部區域 A 之亮度分布，並計算在各位置之近似度，並探索匹配度最高的位置。近似度之評價指標，可使用亮度分布之相關或差分值、或者乘法等，在使用相關之情形，係探索相關值最大的(接近 1)位置，在使

用差分值之情形係探索差分值最小的(接近 0)位置。接著，以匹配度最高位置之近似度作為該位置之代表近似度，並記錄於 RAM63。在後續則就使用相關值作為近似度之情形持續說明。

在局部區域為單層構造之情形，因時間經過所致細胞塊之變化係以細胞之移動作為主體，故在含有對應位置之周邊部，進行區塊比對，而代表近似度之相關值係取大的值(相關值接近 1 之值)。一方面，在局部區域為經複層化之部位的情形，因時間經過所致細胞塊之變化伴隨空間的構造變形或亮度變動，故即使進行周邊探索，則代表近似度之相關值則取小的值(同上，接近 0 之值)。在步驟 S34，係使為比較基準之第一影像之局部區域 A，在影像內移動預設之像素(單位像素或複數像素)移動，依次進行區塊比對，就細胞塊全區域計算各部之代表近似度。藉由該區塊比對所得各部之代表近似度係表示該各部複層化之狀態，代表近似度之分布就是表示細胞塊全體之複層化之狀況。

在此，相關值之大小，隨著自單層狀態進行至複層化，則值減小，要表示複層化之程度則難以處理。因此，在影像處理裝置 100 之處理係將步驟 S35 中代表近似度之相關值予以反轉，隨著複層化之進行，而使值變大($0 \rightarrow$ 接近 1)。具體言之，使用相關值作為近似度之情形，進行 $1 -$ 相關值之處理，使用差分值作為近似度之情形則進行 $|$ 差分值 $|$ 之處理。在本說明書中，藉此該處理所計算的代表近似度係記載為「複層化程度」。此外，相關值在計算上雖可取 -1 至 $+1$ 之值，不過負的值(-1 至 0)係使亮度反轉之情形，因於細胞形狀並無意義，故所計算的相關值為負值之情形，則以零替換，進行 $1 -$ 相關值之處理。

第十二圖中(a)係以虛線例示局部區域之大小，同時，在(b)係例示將以步驟 S35 所計算的複層化程度之分布，以視覺上可容易判斷方式表現。在該(b)圖中，在被外形輪廓線 L 包圍之細胞塊 MC 內部，複層化程度低的部位為暗，複層化程度高的

部位為明亮，其表現係以按照複層化程度之大小的多階段之級數顯示。由該圖明顯可知，就觀察影像所含有之各細胞塊，在第二影像之各時刻中可判斷在細胞塊之何等部位進行何種程度之複層化。

影像處理程式 SP1 亦具備：利用在步驟 S35 中所計算的複層化程度，判別經複層化的部位與不經複層化的部位的功能。亦即，在步驟 S36，將在步驟 S35 中所計算的複層化程度之值與預先設定的預設臨界值相對照，判斷複層化程度之值為臨界值以上之區域已經複層化。步驟 S36 之處理，可因應後續說明之影像處理程式之處理流程或來自操作者之顯示要求等來實行。

如此一來利用所計算之各時刻之細胞塊各部之複層化程度，計算根據近似度之統計量，藉由該時間序列變化判斷細胞塊之成熟度。根據近似度之統計量可例舉(i)複層化程度之總和、(ii)複層化部位之占有率。

作為根據近似度的統計量使用(i)複層化程度之總和之方法，係將以步驟 S35 所計算之各時刻之細胞塊各部之複層化程度，就細胞塊全體予以總和，求得每一細胞塊各時刻之複層化程度之總和，藉由導出該複層化程度之總和之時間序列變化，即可判斷細胞塊之成熟狀態(成熟度)。含有前述複層化部位檢測之程式 SP1，根據複層化程度之總和之時間序列變化，判定細胞塊之成熟度的影像處理程式 SP2 之流程圖係如第十三圖所示。

在圖示之流程圖中，在步驟 A10，含有前文所述細胞塊之複層化部位檢測之程式 SP1(S31 至 S35)，在該步驟 A10 中，係自時刻 t 之第一影像、與時刻 $t+1$ 之第二影像，計算藉由局部區域之區塊比對之時刻 $t+1$ 中細胞塊各部之複層化程度。例如，由時刻 $t=0$ 之觀察影像(第一影像)與時刻 $t=1$ 之觀察影像(第二影像)，計算時刻 $t=1$ 中細胞塊各部之複層化程度，與後述同樣地依順序進行與次時刻之細胞觀察影像之局部區域

之區塊比對，自時刻 $t=t_c-1$ 之觀察影像(第一影像)與時刻 $t=t_c$ 之觀察影像(第二影像)計算時刻 t_c 中細胞塊各部之複層化程度。

在步驟 A20 中，係就於步驟 A10 所計算之各時刻之細胞塊各部之複層化程度(參照第十二圖(b))就細胞塊全體予以總和，計算每一細胞塊各時刻(時刻 $t=1,2,\dots,t_c-1,t_c\dots$)之複層化程度之總和。藉此可掌握在各時刻中各細胞塊何種程度之複層化。

在步驟 A30，係順著時刻 $t=1,2,3,\dots,t_c-1,t_c,\dots$ 將步驟 A20 所計算之各時刻之複層化程度之總和之值並列成時間序列，就各細胞塊導出複層化程度之總和之時間序列變化。第十四圖係表示，著眼於觀察影像中之一個細胞塊，將藉由步驟 A20 之時間序列變化導出處理所計算之複層化程度之總和之時間變化予以圖表化。圖中之橫軸為自時刻 $t=0$ 之經過時間、縱軸為複層化程度之總和，總和之值除以局部區域之分割數並予正規化(normalization)之情形，則成為 0 至 1 之值。

在細胞培養之初期過程，於細胞塊內部細胞僅是二維的擴展，因細胞各個之構造清楚，故複層化程度之總和係以較小值推移。細胞塊成長並開始複層化時，由於細胞之構造則急遽變化成三維並複雜化，故複層化程度之總和之值開始上升，與複層化區域之擴大一起上升。複層化區域若擴展至細胞塊之大致全區域時，總和值之上升鈍化，幾乎不再上升。再者時間一經過，則今後經複層化的區域之各個細胞變成非常小而漸呈微細構造變化，故複層化程度之總和取最大值後，有著若干降低之傾向並推移。

因此，可自由步驟 A30 之處理所導出的複層化程度之總和之時間序列變化資訊(稱為複層化程度時間序列資訊)來判斷各細胞塊之成熟狀態。例如，在複層化程度時間序列資訊中，複層化程度之總和開始上升時，可判斷以該細胞塊之複層化之成長開始進行，在複層化程度之總和上升時可判斷在成長

中。又，複層化程度之總和取在預定以上的最大值時，或者超越峰值進入穩定期或減少期時，則可判斷該細胞塊已成熟。

在影像處理程式 SP2，係自步驟 A30 中所導出複層化程度之時間序列資訊，就觀察影像中各細胞塊，在步驟 A40 計算至指定時刻 t_c (例如最新之觀察時機)為止複層化程度之總和是否具有最大值，在具有最大值之情形，則判斷該細胞塊為成熟的細胞塊。一方面，至指定時刻 t_c 為止不具有最大值之情形，則判斷該細胞塊尚未成熟。

接著，根據該影像處理程式 SP2 所致的成熟判斷，就判斷已成熟的細胞塊，實行前文所述影像處理程式 GP1、GP2 所致的細胞構成之解析處理，並輸出細胞資訊之顯示或發生起源細胞之顯示。如此一來，預先進行成熟判定，根據在指定時刻中自動選擇已充分成熟的細胞，予以解析處理之構成，可將解析非為必要的未成熟細胞等除外，減輕處理負擔，而僅就分株或藥效試驗等所使用之充分成熟的細胞，以高速實行起源資訊之解析。

根據近似度之統計量使用(ii)複層化部位之佔有率之方法，係自步驟 S35 中所計算之細胞塊各部之複層化程度之分布，計算相對於各時刻之各細胞塊中細胞塊全體(在指定解析範圍之情形為指定區域)之複素化部位之佔有比率，亦即，藉由計算複層化部位之佔有率，導出該時間序列變化，而判斷細胞塊之成熟狀態(成熟度)。含有前文所述區塊比對所致的複層化部位檢測之程式 SP1，根據複層化部位之佔有率之時間序列變化來判定細胞塊之成熟度的影像處理程式 SP3 之流程圖係如第十五圖所示。

在圖示之流程圖中，於步驟 B10 係含有前文所述細胞塊之複層化部位檢測之程式 SP1(S31 至 S36)，在該步驟 B10 中，係自時刻 t 之第一影像與次時刻 $t+1$ 之第二影像，藉由局部區域之區塊比對計算時刻 $t+1$ 中細胞塊各部之複層化程度，並進行按照所計算複層化程度之大小予以複層化的部位之檢

測。例如，自時刻 $t=0$ 之觀察影像(第一影像)與時刻 $t=1$ 之觀察影像(第二影像)檢測在時刻 $t=1$ 中細胞塊之複層化部位，在後續同樣地依順序進行與次時刻之觀察影像之區塊比對，自時刻 $t=t_c-1$ 之觀察影像(第一影像)與時刻 $t=t_c$ 之觀察影像檢測時刻 t_c 中細胞塊之複層化部位。

在步驟 B20 係就在步驟 B10 所檢測之複層化部位，計算各細胞塊所佔複層化部位之佔有率(面積比率)，計算每一細胞塊在各時刻(時刻 $t=1, 2, \dots, t_c-1, t_c, \dots$) 中複層化部位之佔有率。藉此可掌握各時刻中各細胞塊進行何等程度之複層化。

在步驟 B30，係將在步驟 B20 所計算之各時刻之複層化部位之佔有率之值順著時刻 $t=1, 2, 3, \dots, t_c-1, t_c, \dots$ 排列成時間序列，就各細胞塊導出複層化部位佔有率之時間序列變化。第十六圖係著眼於觀察影像中之一個細胞塊，將以步驟 B20 之時間序列變化導出處理所計算之複層化部位佔有率之間的變化予以圖表化。圖中之橫軸為自時刻 $t=0$ 之經過時間，縱軸為複層化部位之佔有率，而成為 0 至 100% 之值。

在細胞培養之初期過程，由於複層化部位大部分不存在，故複層化部位之佔有率以較低值推移。在細胞塊成長而複層化一開始時，則佔有率開始提高，並與複層化區域之擴大一起上升。複層化區域擴展至細胞塊之大致全區域時，佔有率之上升鈍化，且在高佔有率幾乎不再上升。

因此，自以步驟 B30 之處理所導出的複層化部位之佔有率之時間序列變化資訊(稱為複層化佔有率時間序列資訊)，而可判斷細胞塊之成熟狀態。例如，在複層化佔有率時間序列資訊中，在複層化部位之佔有率開始上升時，可判斷在該細胞塊開始複層化之成長，在複層化部位之佔有率上升時則判斷在成長中。又，複層化部位之佔有率在預設以上之值時，可判斷該細胞塊已成熟。

在影像處理程式 SP3 中，自步驟 B30 中所導出之複層化佔有率時間序列資訊，就觀察影像中之各細胞塊，將指定時刻

t_c (例如最新之觀察時機)中複層化部位之佔有率，與預先設定作為成熟度之判定基準的規定佔有率，在步驟 B40 中加以對比，在複層化部位之佔有率為規定佔有率以上之情形，則判斷該細胞塊為已成熟之細胞塊。一方面，在指定時刻 t_c 中複層化部位之佔有率小於規定佔有率之情形，則判斷該細胞塊尚未成熟。雖然規定佔有率可按照觀察對象之細胞之類別或特性、觀察目的等而適宜設定，不過在 iPS 細胞或 ES 細胞等之情形，一般而言係設定於 70 至 90% 左右之範圍內。

接著，就根據該影像處理程式 SP3 所致的成熟判斷，判斷為成熟的細胞塊，實行前文所述影像處理程式 GP1、GP2 所致的細胞構成之解析處理，並輸出細胞資訊之顯示或發生起源細胞之顯示。如此一來，根據預先進行成熟判定，在指定時刻中自動選擇已充分成熟的細胞予以解析處理之構成，則可將解析非為必要的未成熟細胞等除外，減輕處理負擔，僅就分株或藥效試驗等所使用之充分成熟之細胞，以高速實行起源資訊之解析。接著，就利用「根據細胞塊之輪廓附近之亮度值之統計量」作為複層化特徵量之成熟度判定手法加以說明。

(2)利用根據細胞塊之輪廓附近之亮度值之統計量的手法

使細胞予以平面培養時之觀察影像係如第十七圖的示意圖。在培養初期，係如同圖(a)所示，匯集之細胞 C 接著於培養皿等之培養基底面，使細胞塊二維地擴展。因此，在細胞塊 MC 之輪廓附近不太發生所謂「摻雜質(halos)」。一方面，細胞塊成長並複層化，變得能進行三維地增殖時，由於在細胞塊之輪廓部產生厚度，故如同圖(b)所示，因而在細胞塊 MC 之輪廓附近產生摻雜質 H。輪廓附近之摻雜質，在觀察光學系(54a、55a)為相位差顯微鏡之情形，可更明瞭地顯現。

本手法係利用伴隨此種細胞塊之複層化而成熟，在輪廓附近產生摻雜質而使亮度值變化之特性。根據亮度值之統計量之例，係提示使細胞塊之輪廓附近之亮度值予以總和的亮度總和，沿著對細胞塊之總輪廓長之輪廓的一定亮度值以上之部分

(摻雜質)之長度之比率(摻雜質長度/總輪廓長度)。本手法之影像處理程式 SP4 之流程圖係如第十八圖所示。

影像解析部 120 係首先讀出(read out)步驟 C10 中記憶於 RAM63 中的時刻 $t=0,1,2,\dots,t_c-1,t_c$ 之時間序列影像，在步驟 C15 中相對於各時刻之觀察影像，藉由與影像處理程式 GP1、GP2 中說明內容同樣的手法，進行觀察影像中所含有細胞之提取、標記、及在各影像間細胞之一一對應。

在步驟 C20，相對於在步驟 C15 提取的各時刻之細胞塊之輪廓部，根據前述亮度值計算統計量。例如，根據亮度值之統計量為輪廓附近之亮度總和之情形，就沿著各細胞塊之輪廓的近接區域，計算在各細胞塊亮度值之總和。近接區域之大小，亦即相對於步驟 C15 所提取的輪廓線之外周方向之框之寬度，在使觀察對象之細胞塊予以複層化時，按照以該觀察系所觀察的摻雜質之出現區域而可適宜設定。根據亮度值之統計量相對於細胞塊之總輪廓長的摻雜質之長度之比率之情形，相對於在步驟 C15 所提取的細胞塊之輪廓線之總輪廓長，計算在細胞塊之近接區域沿著為一定亮度值以上之部分之輪廓線的方向之長度之比率。

在步驟 C30，係根據在步驟 C20 所計算之各時刻之亮度值之統計量順著時刻 $t=0,1,2,\dots,t_c-1,t_c$ 排列成時間序列，就各細胞塊導出根據亮度值的統計量之時間序列變化。第十九圖，係表示就觀察影像中一個細胞塊，藉由步驟 C20 之時間序列變化導出處理所計算之輪廓附近之亮度總和之時間的變化予以圖表化。圖中之橫軸係自時刻 $t=0$ 之經過時間，縱軸係輪廓附近之亮度值之總和。

如第十七圖示意圖所示，在細胞培養之初期過程(a)，匯集的細胞 C 接著於培養基底面並擴展為二維，在各個細胞 C 或集合的細胞塊 MC 之輪廓附近幾乎不見摻雜質，輪廓附近之亮度總和在低的狀態下變化。在細胞塊成長並開始複層化時，在接近因複層化而使厚度增大的部位的輪廓附近呈現明亮的摻

雜質，而亮度總和開始漸漸增加，與複層化區域之擴大一起增大。接著，如(b)般複層化區域擴展至細胞塊 MC 之大致全區域時，則細胞塊全體被明亮的摻雜質 H 包圍，輪廓附近之亮度總和幾乎不再增加。作為根據亮度值的統計量，在使用相對於細胞塊之總輪廓長的摻雜質長度之比率之情形，亦以同樣的時間序列變化進行推移。

因此，可自根據以步驟 C30 之處理所導出的亮度值之統計量之時間序列變化資訊(稱為亮度統計量時間序列資訊)，判斷各細胞塊之成熟狀態。例如，在亮度統計量時間序列資訊中，在輪廓附近之亮度總和開始增加時，可判斷在該細胞塊開始複層化之成長，在亮度總和增大時，判斷在成長中。接著，亮度總和之增加傾向變的和緩，增加率呈現預設值以下時，或者亮度總和呈現規定之總和臨界值以上時，可判斷該細胞塊已成熟。

在影像處理程式 SP4 中，自步驟 C30 中所導出亮度統計量時間序列資訊，就觀察影像中各細胞塊，將指定時刻 t_c (例如最新觀察時機)中之輪廓附近之亮度總和與作為成熟度之判定基準而預先設定的規定之總和臨界值在步驟 C40 中相對照，在輪廓附近之亮度總和為規定之總和臨界值以上之情形，則判斷該細胞塊為成熟的細胞塊，一方面，在指定時刻 t_c 中輪廓附近之亮度總和小於規定之總和臨界值之情形，則判斷該細胞塊尚未成熟。根據亮度值之統計量，亦與相對於細胞塊之總輪廓長的摻雜質長度之比率之情形相同，將相對於指定時刻 t_c 中細胞塊之總輪廓長的摻雜質長度之比率，與作為成熟度之判定基準而預先設定之摻雜質之規定比率相對照，在相對於總輪廓長的摻雜質長度之比率為規定比率以上情形，則判斷細胞塊已成熟。

接著，根據影像處理程式 SP4 所致的成熟判斷，就判斷為成熟的細胞塊，實行前文所述影像處理程式 GP1、GP2 所致的細胞構成之解析處理，並輸出細胞資訊之顯示或發生起源細胞

之顯示。因此，在本手法中，由於在指定時刻中已十分成熟的細胞被自動選擇並進行發生起源細胞等之解析處理，故將解析非為必要之未成熟的細胞等除外，減輕處理負擔，可以高速實行起源資訊之解析。接著利用「根據細胞塊之輪廓形狀之統計量」作為複層化特徵量的成熟度判定手法加以說明。

(3)利用根據細胞塊之輪廓形狀之統計量之手法

如第十七(a)圖所示，在細胞培養之初期過程，因細胞 C 匯集而形成細胞塊 MC，故在擴展成二維之細胞塊 MC 之輪廓附近存在各個細胞，細胞塊之輪廓形狀成為含有多數凹凸的複雜形狀。在細胞塊之成長進行時，輪廓部之凹凸被緩緩吸收，輪廓形狀成為平穩，在藉由複層化使細胞構造三維地形成的時候，如第十七(b)圖所示，細胞塊 MC 之輪廓形狀已呈比較圓。

本手法係此種在細胞塊進行成熟的過程，利用細胞塊之輪廓形狀變化的特性。作為根據細胞塊之輪廓形狀的統計量之代表例，提示細胞塊之輪廓之複雜度。細胞塊之輪廓之複雜度可以例如相對於細胞塊之面積的周圍長之比率(周圍長/面積)予以規定。本手法之影像處理程式 GP5 之流程圖如第二十圖所示。

影像解析部 120 係在步驟 D10 中讀出時刻 $t = 0, 1, 2, \dots, t_c - 1, t_c$ 之時間序列影像，在步驟 D15 中藉由相對於各時刻之觀察影像，與影像處理程式 GP1、GP2 中所說明相同之方法，即可進行觀察影像中所含有細胞之提取、標記、及各影像間之細胞之一一對應。

在步驟 D20，係相對於步驟 D15 所提取的各時刻之細胞塊之輪廓部，計算根據前述細胞塊之輪廓形狀的統計量。在本實施例中，係就細胞塊之輪廓之複雜度，計算相對於最外輪廓所提取的細胞塊之面積的周圍長(總輪廓長)之比率。

在步驟 D30，根據步驟 D20 中所計算之各時刻之輪廓形狀的統計量，順著時刻 $t = 0, 1, 2, \dots, t_c - 1, t_c$ 排列成時間序列，就各細胞塊根據輪廓形狀導出統計量之時間序列變化。第二十一圖

係就觀察影像中之一個細胞塊，將由步驟 D20 之時間序列變化導出處理所計算之細胞塊輪廓之複雜度之時間的變化予以圖表化。圖中之橫軸係自時刻 $t=0$ 之經過時間、縱軸係輪廓之複雜度。

如第十七(a)圖、第十七(b)圖所示，在細胞培養之初期過程，細胞匯集而細胞塊擴展成二維，由於細胞塊之輪廓為含有多數凹凸的複雜形狀，故在步驟 D20 中所計算的輪廓之複雜度在高值變動。在細胞塊之成長進行時，凹凸被緩緩地吸收，輪廓形狀成為平穩，輪廓之複雜度隨著時間之經過而降低。再者，在細胞塊內部進行複層化時，細胞塊之輪廓形狀呈橢圓至圓形，輪廓之複雜度在低值幾乎不再減少。

因此，自根據以步驟 D30 之處理所導出的細胞塊之輪廓形狀的統計量之時間序列變化資訊(稱為輪廓形狀統計量時間序列資訊)，可判斷各細胞塊之成熟狀態。例如，在輪廓形狀統計量時間序列資訊中，在輪廓之複雜度開始降低時，可判斷該細胞塊向著複層化之轉移期，在輪廓之複雜度降低時，則可判斷在複層化之成長中。接著，輪廓之複雜度之降低傾向變的和緩，降低率成為預設值以下時，或者輪廓之複雜度在規定之複雜度以下時，則可判斷該細胞塊已成熟。

在第二十圖所示影像處理程式 GP5 中，自步驟 D30 中所導出輪廓形狀統計量時間序列資訊，就觀察影像中之各細胞塊，將指定時刻 t_c (例如最新之觀察時機)中輪廓之複雜度與作為成熟度之判定基準而預先設定之規定複雜度在步驟 D40 中相對照，在細胞塊之輪廓之複雜度為規定之複雜度以下之情形，則判斷該細胞塊為成熟的細胞塊。一方面，在指定時刻 t_c 中細胞塊之輪廓之複雜度超過規定之複雜度之情形，則判斷該細胞塊尚未成熟。

接著，根據影像處理程式 SP5 所致的成熟判斷，就判斷為成熟的細胞塊，實行前文所述影像處理程式 GP1、GP2 所致的細胞構成之解析處理，並輸出細胞資訊之顯示或發生起源細胞

之顯示。因此，即使在本手法中，在指定時刻中充分成熟的細胞被自動選擇並進行發生起源細胞等之解析處理，故將解析非為必要之未成熟的細胞等除外，可減輕處理負擔，並可以高速實行起源資訊之解析。

第一圖係將以上說明的影像處理程式 GP(GP1、GP2)與影像處理程式 SP(SP1 至 SP5)加以組合，在指定時刻 t_c 中自動選擇充分成熟的細胞，進行發生起源細胞等之解析處理的自動解析程式 AP 之概要流程圖。

在自動解析程式 AP，首先讀出並取得步驟 S1 中時刻 $t=0,1,2,\cdots,t_c-1,t_c,\cdots$ 之時間序列影像，在步驟 S2 中，相對於各時刻之觀察影像，藉由前文所述手法，進行觀察影像中所含有細胞之提取、標記、及各影像間之細胞之一一對應。

接著，在步驟 S3，係使影像處理程式 SP1 至 SP5 之任一者，或者該等影像處理程式 SP1 至 SP5 予以複數組合，在指定時刻 t_c (例如最新之觀察時機)中就觀察影像所含有之細胞塊，進行各細胞塊是否充分成熟之成熟度之判定處理。

接著，在步驟 S4 中，就藉由步驟 S3 之成熟度判定處理判定成熟的細胞塊，進行對關連之細胞塊之附 ID(或者除了判定未成熟的細胞塊之對細胞塊之附 ID)。接著，在步驟 S5 中影像處理程式 GP1、GP2 之至少一者，亦即，使時間序列影像沿著時間軸在回溯方向或經時間方向之任一方向或兩方向，進行細胞追蹤所致的 ID 接替(細胞資訊之接替)。接著進行步驟 S6 中細胞之發生起源細胞與構成細胞數之計算、分類等之解析，在步驟 S7 中輸出顯示解析結果於顯示面板 72 等。

實行自動解析程式 AP，並顯示解析結果顯示之應用程式之使用者介面之構成例係如第二十二圖所示。在該實施例之細胞塊分類介面設置：在顯示面板 72 之畫面，自收容於培養室 2 內之複數個培養容器 10 選擇觀察對象之培養皿選擇資訊框 81；用以自所選擇的培養容器之全體影像指定特定之觀察位置之觀察位置顯示資訊框 82；就所指定的觀察位置，顯示解析

結果之影像的觀察影像顯示資訊框 83；就指定的觀察位置(或全體影像)所含有之細胞塊，顯示按照發生起源細胞數的組織圖之導數(derivative)組織圖顯示資訊框 85 等。

在圖示之實施例，係表示在培養皿選擇資訊框 81 中選擇編碼號碼 Cell-002 之培養容器，在觀察位置顯示資訊框 82 中以滑鼠等指定圍繞框之部位的狀態。在觀察影像顯示資訊框 83 中，係例示就藉由成熟細胞之判定處理判定在指定時刻 t_c 為成熟的細胞塊，顯示解析結果，在圖中係按照構成細胞塊之發生起源細胞數進行彩色之色彩區別顯示之構成。由該顯示可就觀察影像中已成熟的細胞塊，可瞬間且正確地掌握是否由單一細胞所構成群體為存在，或是由幾個之發生起源細胞所構成之細胞塊等。此外，藉由切換設置於該資訊框下部的顯示選擇按鈕，即可如第八圖所示，進行各細胞塊之單一化數之顯示，或第六圖所示各細胞塊之發生起源細胞之顯示等。

在導數組織圖顯示資訊框 85，係就判定在指定時刻 t_c 為成熟的細胞塊，顯示橫軸為構成細胞塊之發生起源細胞之數(單一化數)、縱軸為各單一化數之細胞塊之個數之組織圖。藉由該組織圖顯示，可掌握所培養細胞塊之全體像，例如，從評價資料細胞或培養條件等之觀點言之，成為有效的資訊。

如以上說明，在本發明之細胞之分類手法、影像處理程式及影像處理裝置中，自以成像裝置所攝影之時間序列影像，使第一、第二影像沿著時間軸依順序偏移，同時進行細胞之提取及一一對應，使細胞之單一化或分離作為各細胞之細胞資訊依順序接替，根據所接替的細胞資訊進行細胞之分類。因此，根據本發明，即使培養觀察已經過一定時間，藉由細胞之成長或單一化而使多數細胞在如成熟期之情形，亦可正確地掌握各細胞之起源或構成，並準確地進行細胞之挑選・評價。

此外，在以上說明的實施形態，雖然例示之構成為，在培養觀察系統 BS 中被成像裝置攝影，並讀出記憶於 RAM63 的時間序列影像(影像數據)，解析各細胞，不過亦可構成為，在

其它觀察系統中，讀取記錄於所攝影之磁性記憶介質等的時間序列影像，或讀取經由通信線路傳送而至之時間序列影像等，並解析細胞構成。

接著，就本發明之實施形態之細胞塊之製造方法參照第二十三圖並予說明。該製造方法，基本上係包含：培養細胞之培養步驟(S110)；與使用前述影像處理裝置，觀察在該培養步驟中所培養之細胞，進行因培養而變化之細胞中細胞塊之分類之分類步驟(S120 至 S190)。

更具體言之，其包含：培養細胞之培養步驟(S110)；將在該培養步驟中所培養之細胞，以成像裝置攝影，取得因培養而變化之細胞中細胞塊之時間序列影像之取得步驟(S120)；在該取得步驟中在取得的時間序列影像之中自預設之時刻所攝影之第一影像，提取該影像所含有之細胞之第一提取步驟(S130)；自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影之第二影像提取該影像所含有之細胞的第二提取步驟(S140)；進行自第一影像所提取之細胞與自第二影像所提取之細胞之一一對應，判斷是否該第一影像之複數個細胞被第二影像一體化成為 1 個，或者是否第一影像之 1 個細胞被第二影像分離成複數個(S150)；在使第一影像之複數個細胞被第二影像一體化而成為 1 個之情形，對已一體化之細胞賦予一體化前之細胞資訊之步驟(S160)；在使第一影像之 1 個細胞在第二影像分離成複數個之情形，則在已分離的各細胞，賦予分離前之細胞資訊之步驟(S170)。就在步驟 S120 取得的各時間序列影像進行該等步驟 S130 至 S170，使各時間序列影像作為該第一及第二影像沿著時間軸依順序分配，同時實行該細胞之提取及一一對應，依順序接替影像中所含有各細胞之該細胞資訊之接替步驟(S180)；就任意時刻所攝影之影像所含有之細胞，根據該接替的細胞資訊，進行細胞塊之分類之分類步驟(S190)；根據預設之基準，挑選細胞塊之挑選步驟(S200)；採取、保存已挑選的細胞塊之採取保存步驟(S210)，而構成製造方法。此外，所培

養之細胞可為來自人、牛、馬、豬、老鼠等動物之細胞，亦可來自植物之細胞。又，細胞塊之保存亦可為凍結保存。

【圖式簡單說明】

第一圖係例示影像處理程式 AP1，其係進行自動識別已成熟細胞並進行影像解析之流程圖。

第二圖係顯示作為本發明之適用例的培養觀察系統之概要構成圖。

第三圖係前述培養觀察系統之方塊圖。

第四圖係例示影像處理裝置之概要構成之方塊圖。

第五圖係在回溯時間軸之方向解析時間序列影像的影像處理程式 GP1 之流程圖。

第六圖係就以成像裝置所攝影的時間序列影像，以影像處理程式 GP1 所實行之影像解析之態樣的示意說明圖。

第七圖係將追蹤所致 ID 接替，適用於在經時間方向解析時間序列影像的影像處理程式 GP2 之情形的流程圖。

第八圖係就以成像裝置所攝影之時間序列影像，透過影像處理程式 GP2 所實行之影像解析之態樣示意說明圖。

第九圖係在影像處理程式 GP1、GP2 中進行複層化部位之檢測處理的影像處理程式 SP1 之流程圖。

第十圖係間隔預設之時間所攝影之細胞塊之第一影像(a)及第二影像(b)。

第十一圖係在第一影像中所設定之局部區域之構成例(a)；與就第二影像中含有對應位置之近旁部，用以說明實行區塊比對之狀況之說明圖(b)。

第十二圖係例示對細胞塊之局部區域之大小的說明圖(a)；與藉由影像解析所計算之複層化程度之分布，以黑至白之級數表現在視覺上可予掌握的程度。

第十三圖係根據複層化程度之總和之時間序列變化判定細胞塊之成熟度之影像處理程式 SP2 之流程圖。

第十四圖係將複層化程度之總和之時間的變化予以圖表化的說明圖。

第十五圖係根據複層化部位之佔有率之時間序列變化判定細胞塊之成熟度的影像處理程式 SP3 之流程圖。

第十六圖係將複層化部位之佔有率之時間變化予以圖表化的說明圖。

第十七圖係細胞塊之觀察影像的示意的說明圖、(a)細胞培養之初期過程、(b)複層化區域擴及全區域的成熟狀態。

第十八圖係根據細胞塊之輪廓附近之亮度值總和等之時間序列變化，判斷細胞塊之成熟度的影像處理程式 SP4 之流程圖。

第十九圖係將細胞塊之輪廓附近之亮度值總和之時間變化予以圖表化的說明圖。

第二十圖係根據細胞塊之輪廓形狀之複雜度等之時間序列變化判定細胞塊之成熟度之影像處理程式 SP5 之流程圖。

第二十一圖係將細胞塊之輪廓之複雜度之時間變化予以圖表化的說明圖。

第二十二圖係顯示解析結果的使用者界面之構成例。

第二十三圖係顯示細胞塊之製造方法的流程圖。

【主要元件符號說明】

元件符號	說明
1	外殼
2	培養室
3	存放架
4	搬送單元
5	觀察單元
6	控制單元
7	操作盤
10	培養容器
15	試料台
16	窗部
21	溫度調整裝置
22	加溼器

23	氣體供給裝置
24	循環風扇
25	環境感測器
41	Z 台
42	Y 台
43	X 台
45	支持臂
51	第一照明部
52	第二照明部
53	第三照明部
54	巨觀觀察系
54a	觀察光學系
54c	成像裝置
55	顯微觀察系
55a	觀察光學系
55c	成像裝置
61	CPU(電腦)
62	ROM
63	RAM
65	通信部
71	操作面板
72	顯示面板
81	培養皿選擇資訊框
82	觀察位置顯示資訊框
83	觀察影像顯示資訊框
85	導數組織圖顯示資訊框
100	影像處理裝置
120	影像解析部
130	輸出部
A	局部區域
AP	影像處理程式
BS	培養觀察系統
C	細胞
MC	細胞塊
L	外形輪廓線
H	摻雜質
GP1、GP2	影像處理程式
SP1 至 SP5	影像處理程式(進行成熟度判斷的副程式)

201106010

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99105264

※申請日：

99.7.30

※IPC 分類：

G02B 21/36 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

細胞的分類手法、使用該手法的影像處理程式與影像處理裝置、以及細胞塊的製造方法

二、中文發明摘要：

影像處理程式 AP 係在步驟 S1 讀出時間序列影像，在步驟 S2 進行各時刻之觀察影像中細胞的提取、標記、及細胞之一一對應，在步驟 S3 就於指定時刻 t_c 於觀察影像所含有之細胞，進行成熟度之判定處理。在步驟 S4 係就已判定成熟的細胞進行附 ID，在步驟 S5 中，使時間序列影像沿著時間軸在回溯方向或經時間方向，進行細胞追蹤所致 ID 接替。在步驟 S6 中，根據所接替的 ID 資訊進行各細胞之單一化數之計算、分類，並在步驟 S7 中輸出解析結果。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍：

1. 一種細胞的分類手法，其特徵為，

自於預設之時刻所攝影之第一影像提取影像所含有之細胞，

自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影的第二影像提取影像所含有之細胞，進行自該第一影像所提取的細胞與自該第二影像所提取的細胞之一一對應，使該第一影像之複數個細胞於該第二影像成為一個之情形則對已一體化的細胞賦予一體化前之細胞資訊，在使該第一影像之一個細胞於該第二影像分離成複數個之情形，則對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊，

就時間序列影像，使該第一影像及該第二影像沿著時間軸依順序偏移(displace)同時實行該細胞之提取及一一對應(coordinating)，依順序接替影像中所含有之各細胞之該細胞資訊，

就於任意時刻所攝影之影像所含有之細胞，根據該接替的細胞資訊進行細胞之分類。

2. 如申請專利範圍第 1 項之細胞的分類手法，其中攝影該第一影像之該預設之時刻為時刻 t 、攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間前之時刻 $t-1$ ，該細胞資訊之接替係在沿著該時間序列影像之時間軸使時間回溯(ascend)至觀察開始時期為止之方向實行，

就於該任意時刻所攝影之影像中之細胞，根據回溯至觀察開始時期為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

3. 一種如申請專利範圍第 1 項之細胞的分類手法中，根據細胞構成資訊的細胞塊之分類手法，其特徵為，攝影該第一影像之該預設之時刻為時刻 t ，攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間後之時刻 $t+1$ ，該細胞資訊之接替係在沿著該時間序列影像之時間軸，自觀察開始時期

至時間之經過方向實行，

就該任意時刻所攝影之觀察影像所含有之細胞，根據至該時刻為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

4. 一種影像處理程式，其特徵為，以電腦可資讀取，在作為取得以成像裝置所攝影之影像而進行影像處理之影像處理裝置，用以使電腦發揮作用之影像處理程式中，其包含下列步驟：取得以該成像裝置於預設之時刻所攝影之第一影像，並提取影像所含有之細胞之第一步驟；

取得以該成像裝置於該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影的第二影像，提取影像所含有之細胞之第二之步驟；

進行自該第一影像所提取的細胞與自該第二影像所提取的細胞之一一對應，在該第一影像之複數個細胞於該第二影像成為一個之情形，對已一體化之細胞賦予一體化前之細胞資訊，使該第一影像之一個細胞於該第二影像分離成複數個之情形，對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊之第三步驟；

就時間序列影像沿著時間軸依順序偏移同時實行該第一至第三之步驟，依順序接替影像中所含有之各細胞之該細胞資訊之步驟；

就於指定之時刻所攝影之影像所含有之細胞，輸出該接替的細胞資訊之步驟。

5. 如申請專利範圍第 4 項之影像處理程式，其進一步包含：根據該接替的細胞資訊，使於該指定時刻所攝影之影像所含有之細胞予以分類之步驟；輸出分類結果之步驟。
6. 如申請專利範圍第 5 項之影像處理程式，其中攝影該第一影像的該預設之時刻為時刻 t 、攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間前之時刻 $t-1$ ，接替該細胞資訊之步驟，係沿著該時間序列影像之時間軸在時間回溯至觀察開始時期為止之方向實行，

分類該細胞之步驟，係就該指定之時刻所攝影之影像中之細胞，根據回溯至該觀察開始時期為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數的分類。

7. 如申請專利範圍第 5 項之影像處理程式，其中攝影該第一影像之該預設之時刻為時刻 t ，攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間後之時刻 $t+1$ ，接替該細胞資訊之步驟係沿著該時間序列影像之時間軸，自觀察開始時期於時間之經過方向實行，

分類該細胞之步驟，係就該指定之時刻所攝影之影像中之細胞，根據至該指定時刻所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

8. 如申請專利範圍第 5 至 7 項中任一項之影像處理程式，其包含：自依順序取得之該第一影像及該第二影像計算關於細胞之複層化之特徵量，根據所計算之關於該複層化之特徵量之時間序列變化，判定該指定時刻中影像中各細胞之成熟度的成熟度判定步驟，

進行該細胞之分類的步驟，係就該成熟度判定步驟中判定為已成熟的細胞進行分類。

9. 如申請專利範圍第 8 項之影像處理程式，其中關於該複層化之特徵量，係就該時間序列影像中第一影像與第二影像，以成為前時刻之一影像之細胞塊之局部區域之亮度分布作為樣板，就成為後時刻之另一影像之含有細胞塊之對應位置之近旁部，進行亮度分布之區塊比對而計算，根據匹配度最高位置區域之近似度之統計量。
10. 如申請專利範圍第 8 項之影像處理程式，其中關於該複層化之特徵量係根據該細胞塊之輪廓附近之亮度值之統計量。
11. 如申請專利範圍第 8 項之影像處理程式，其中關於該複層化之特徵量係根據該細胞塊之輪廓形狀之統計量。

12. 一種影像處理裝置，其特徵為具備下述構成：

取得以成像裝置間隔預設之時間攝影細胞的時間序列影像，並解析影像之影像解析部；及輸出該影像解析部所致解析結果之輸出部，其中，

該影像解析部係自預設之時刻所攝影之第一影像提取影像所含有之細胞，並自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影的第二影像提取影像所含有之細胞，進行自該第一影像所提取的細胞與自該第二影像所提取的細胞之一一對應，使該第一影像之複數個細胞於該第二影像成為一個之情形，則對已一體化的細胞賦予一體化前之細胞資訊，使該第一影像之一個細胞於該第二影像分離成複數個之情形，則對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊，就時間序列影像，使該第一影像及該第二影像沿著時間軸依順序偏移同時實行該細胞之提取及一一對應，依順序接替影像中所含有各細胞之該細胞資訊，

該輸出部係就於所指定之時刻所攝影之影像所含有之細胞，輸出該接替的細胞資訊者。

13. 如申請專利範圍第 12 項之影像處理裝置，其中該影像解析部係根據該接替的細胞資訊，將在該指定時刻所攝影之影像所含有之細胞予以分類，

該輸出部係輸出該影像解析部所致的分類結果者。

14. 如申請專利範圍第 13 項之影像處理裝置，其中攝影該第一影像之該預設之時刻為時刻 t ，攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間前之時刻 $t-1$ ，該細胞資訊之接替係沿著該時間序列影像之時間軸使時間回溯至觀察開始時期為止之方向實行，

該細胞之分類係就該指定時刻所攝影之影像中之細胞，根據回溯至該觀察開始時期為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

15. 如申請專利範圍第 13 項之影像處理裝置，其中攝影該第一

影像之該預設之時刻為時刻 t ，攝影該第二影像之時刻係自該預設之時刻至該預設之時間後之時刻 $t+1$ ，該細胞資訊之接替係沿著該時間序列影像之時間軸自觀察開始時期於時間之經過方向實行，

該細胞之分類係就該指定時刻所攝影之影像中之細胞，根據至該指定時刻為止所接替的各細胞之細胞資訊，進行按照成為構成各細胞之起源的細胞數之分類。

16. 如申請專利範圍第 13 至 15 項中任一項之影像處理裝置，其中該影像解析部係自依順序取得之該第一影像及該第二影像，計算關於細胞之複層化之特徵量，根據所計算之關於該複層化之特徵量之時間序列變化，判定該指定時刻中影像中各細胞之成熟度，就判定為已成熟的細胞進行該分類。
17. 如申請專利範圍第 16 項之影像處理裝置，其中關於該複層化之特徵量，係就該時間序列影像中第一影像與第二影像，使成為前時刻之一影像之細胞塊之局部區域之亮度分布作為樣板，就成為後時刻之另一影像之含有細胞塊之對應位置的近旁部，進行亮度分布之區塊比對，並計算根據匹配度最高位置區域之近似度之統計量。
18. 如申請專利範圍第 16 項之影像處理裝置，其中關於該複層化之特徵量係根據該細胞塊之輪廓附近之亮度值之統計量。
19. 如申請專利範圍第 16 項之影像處理裝置，其中關於該複層化之特徵量係根據該細胞塊之輪廓形狀之統計量。
20. 一種細胞塊的製造方法，其特徵為包含，培養細胞之培養步驟；

使用如申請專利範圍第 12 至 19 項中任一項之影像處理裝置，觀察該培養步驟中所培養的細胞，進行因培養而變化之該細胞中細胞塊分類的分類步驟。

21. 一種細胞塊的製造方法，其特徵為包含：培養細胞之培養

步驟；

將該培養步驟中所培養之細胞以成像裝置攝影，自於預設之時刻所攝影之第一影像提取該影像所含有之細胞之第一提取步驟；

自該預設之時刻與間隔預設之時間所攝影之第二影像，提取該影像所含有之細胞之第二提取步驟；

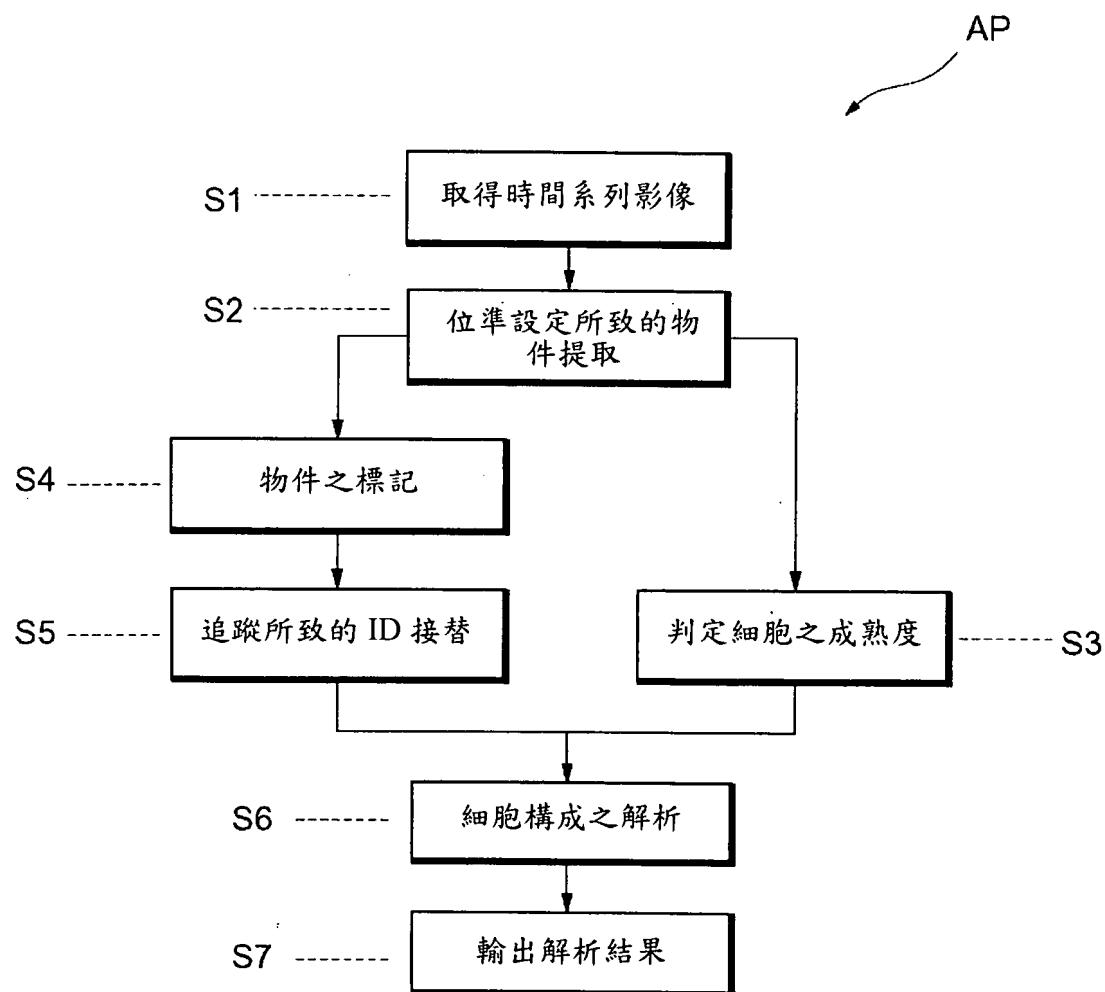
進行自該第一影像所提取的細胞與自該第二影像所提取的細胞之一一對應，使該第一影像之複數個細胞於該第二影像予以一體化成為 1 個之情形，對已一體化的細胞賦予一體化前之細胞資訊，使該第一影像之 1 個細胞於該第二影像分離成複數個之情形，對已分離的各細胞賦予分離前之細胞資訊之資訊賦予步驟；

將該培養步驟中所培養之細胞以該成像裝置在預設之時間間隔予以攝影，獲得時間序列影像，同時使各時間序列影像作為該第一及第二影像沿著時間軸依順序分配同時實行該細胞之提取及一一對應，並依順序接替影像中所含有各細胞之該細胞資訊之接替步驟；

就於任意時刻所攝影之影像中所含有之細胞，將根據該接替的細胞資訊細胞塊予以分類之分類步驟。

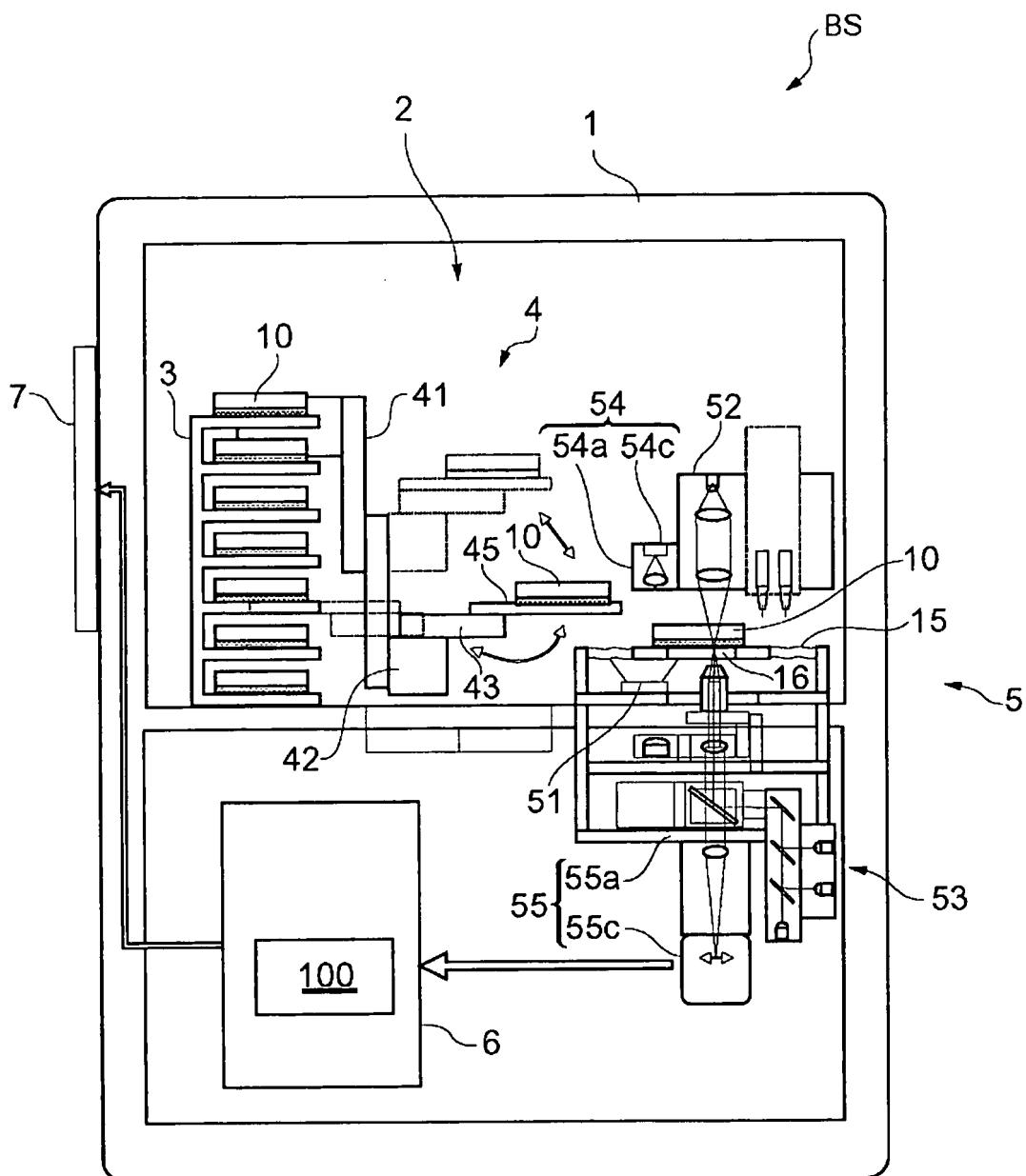
201106010

八、圖式：



第一圖

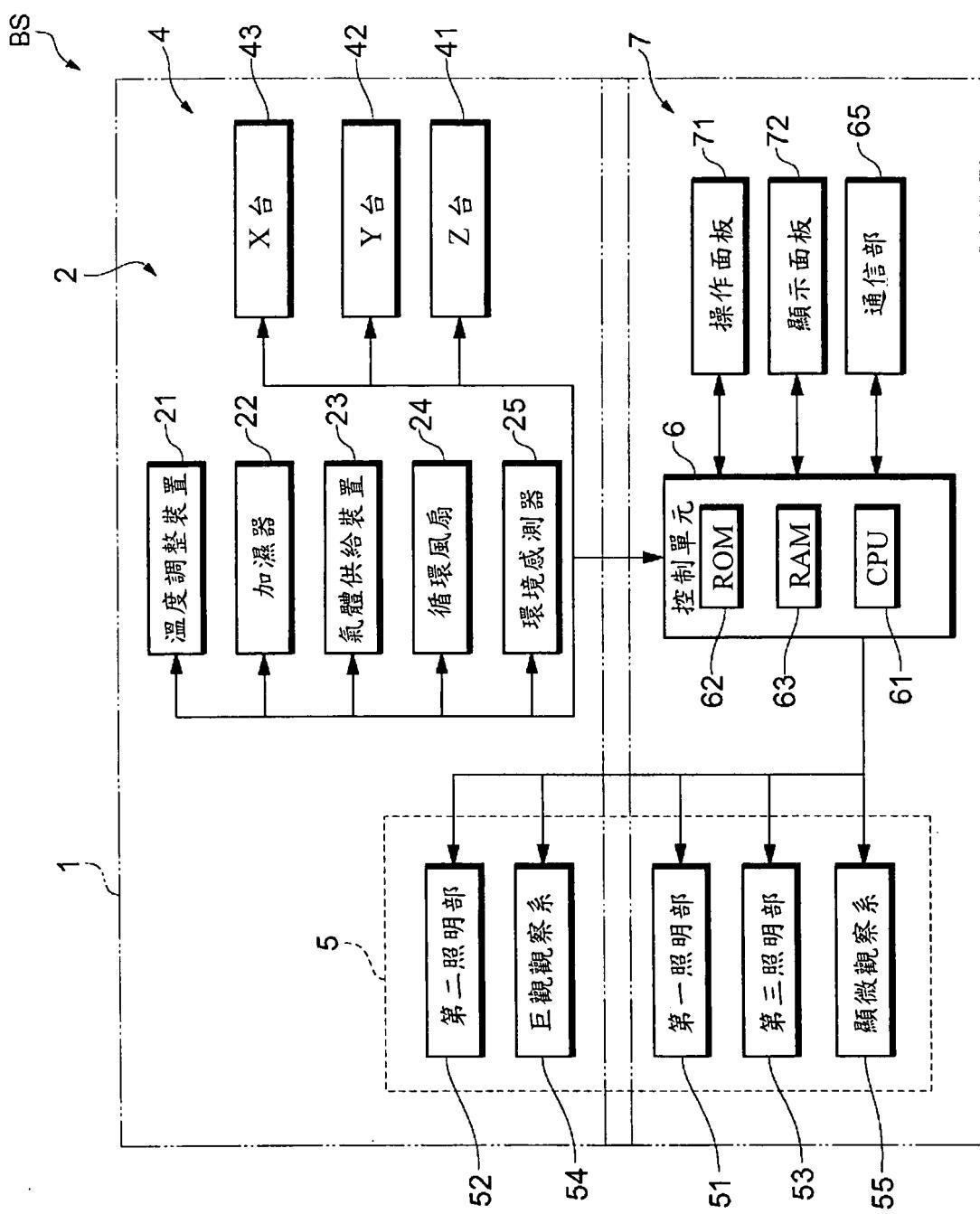
201106010



第二圖

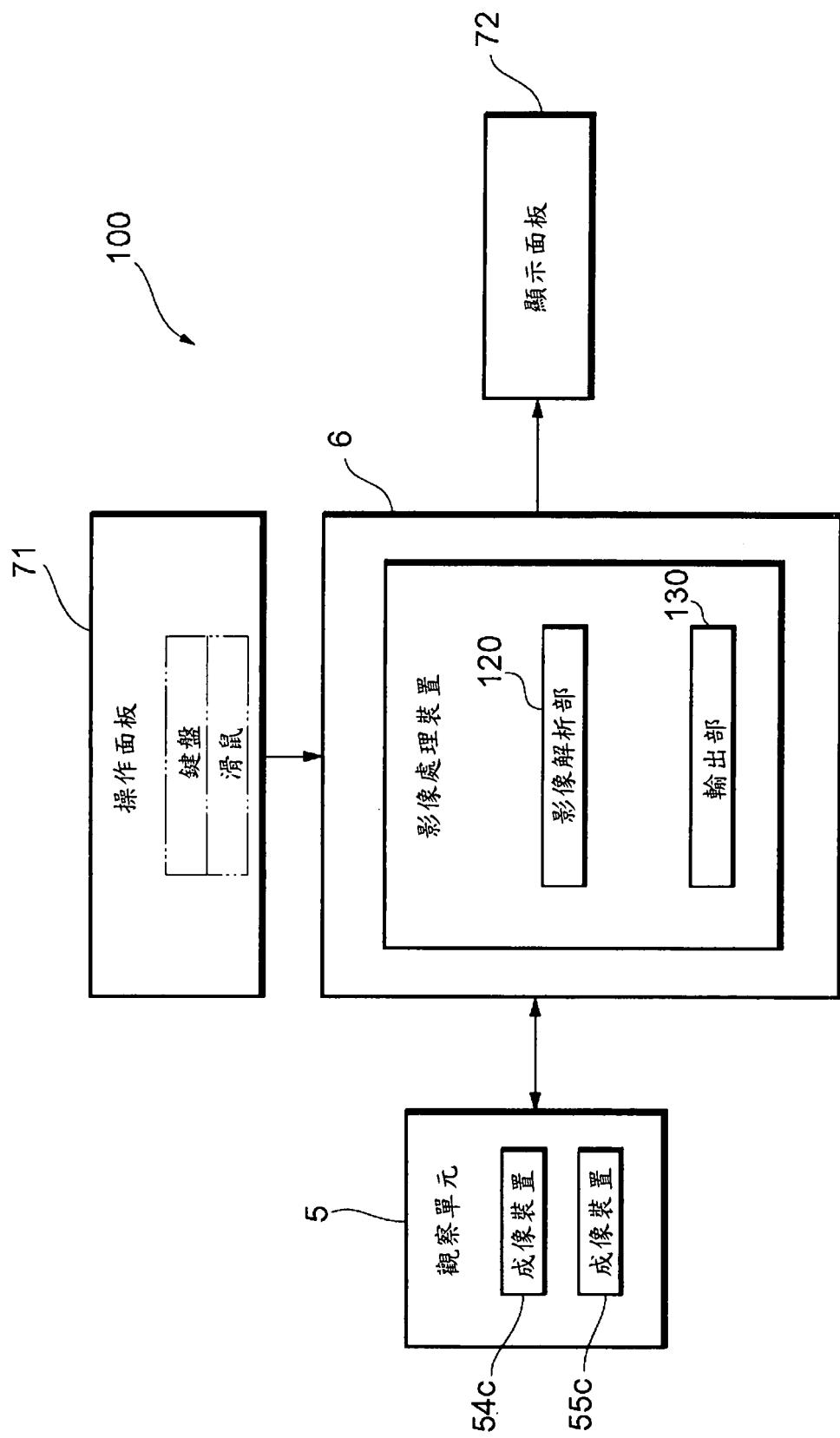
201106010

第三圖

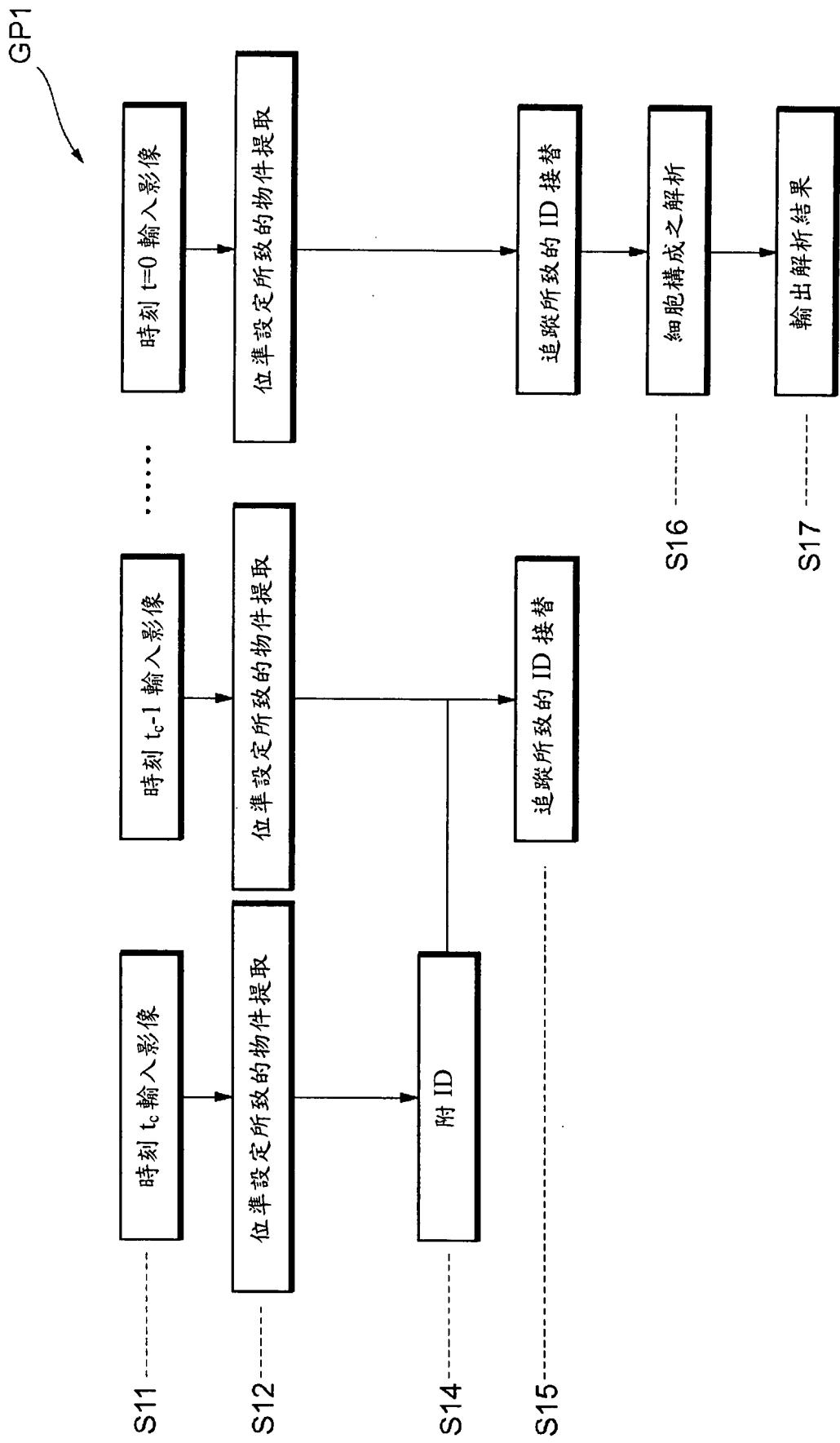


201106010

第四圖

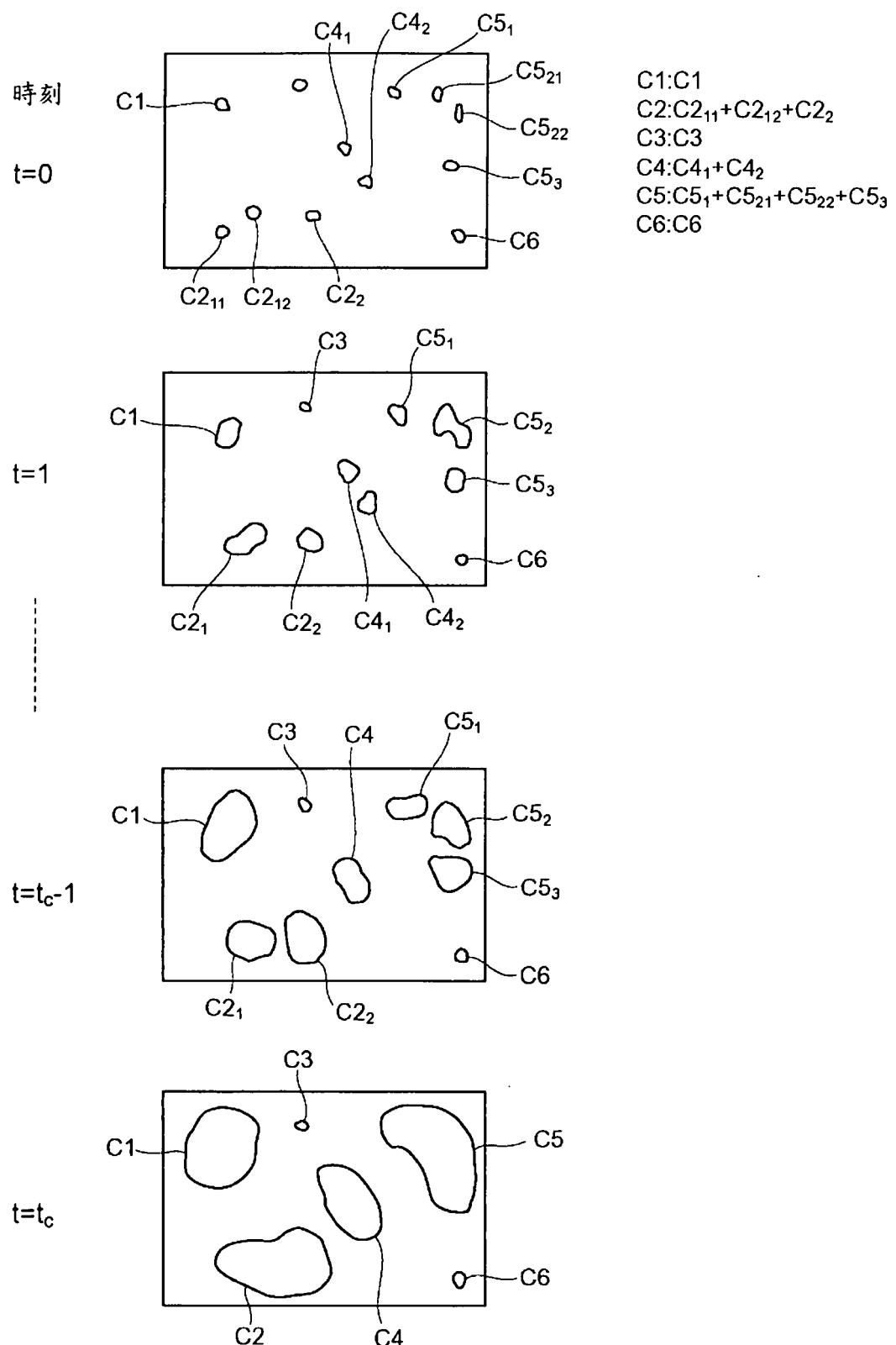


201106010

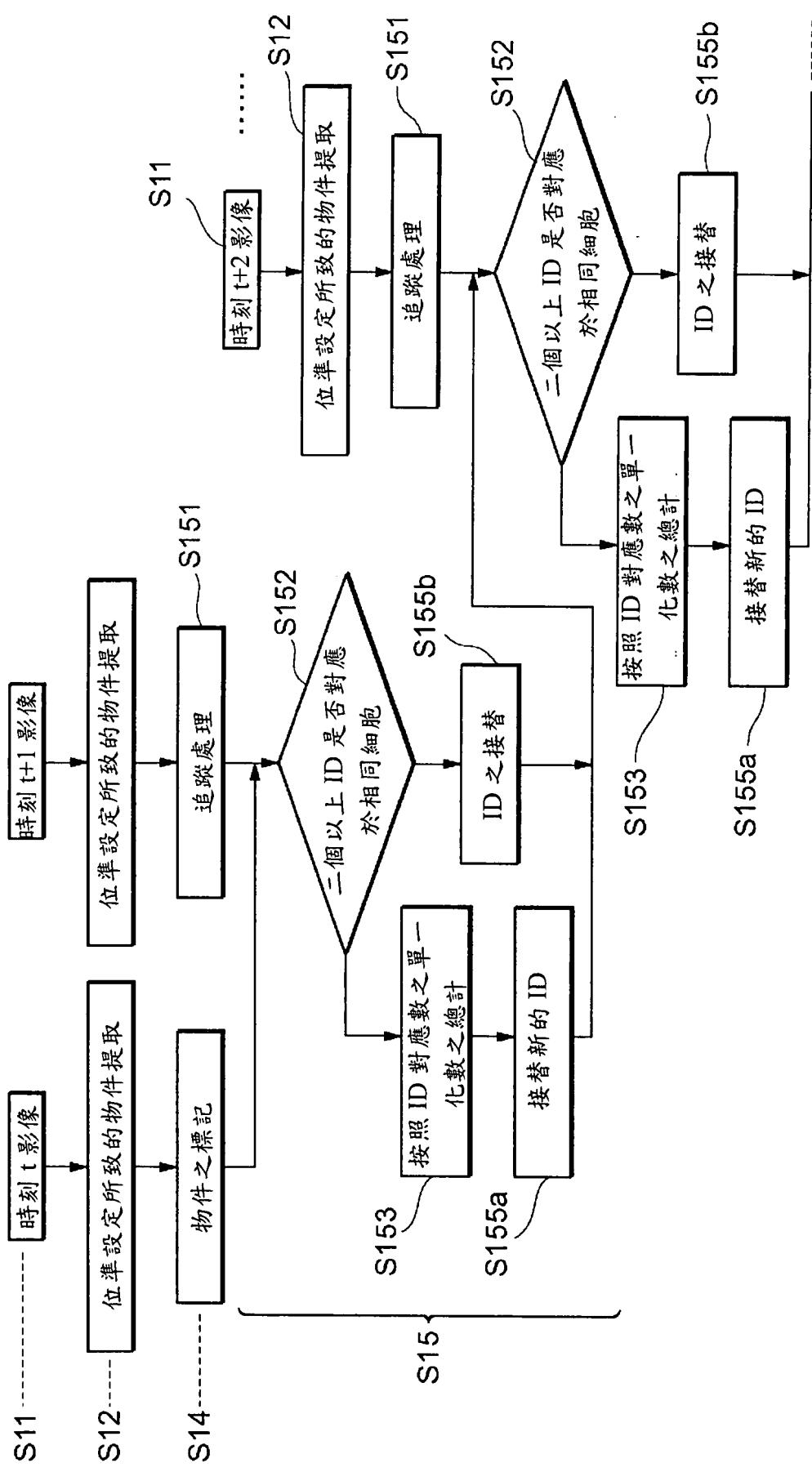


第五圖

201106010

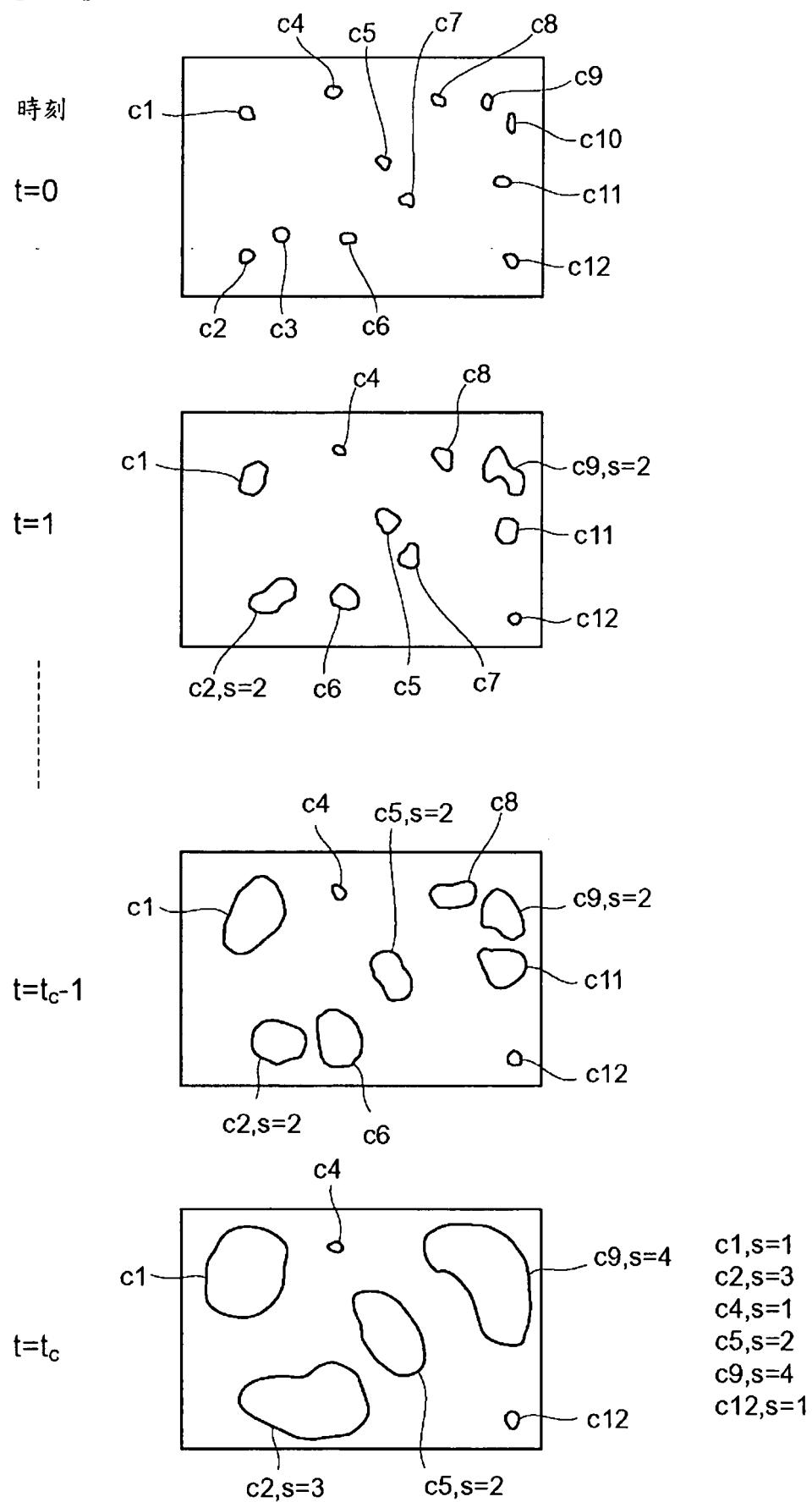


第六圖



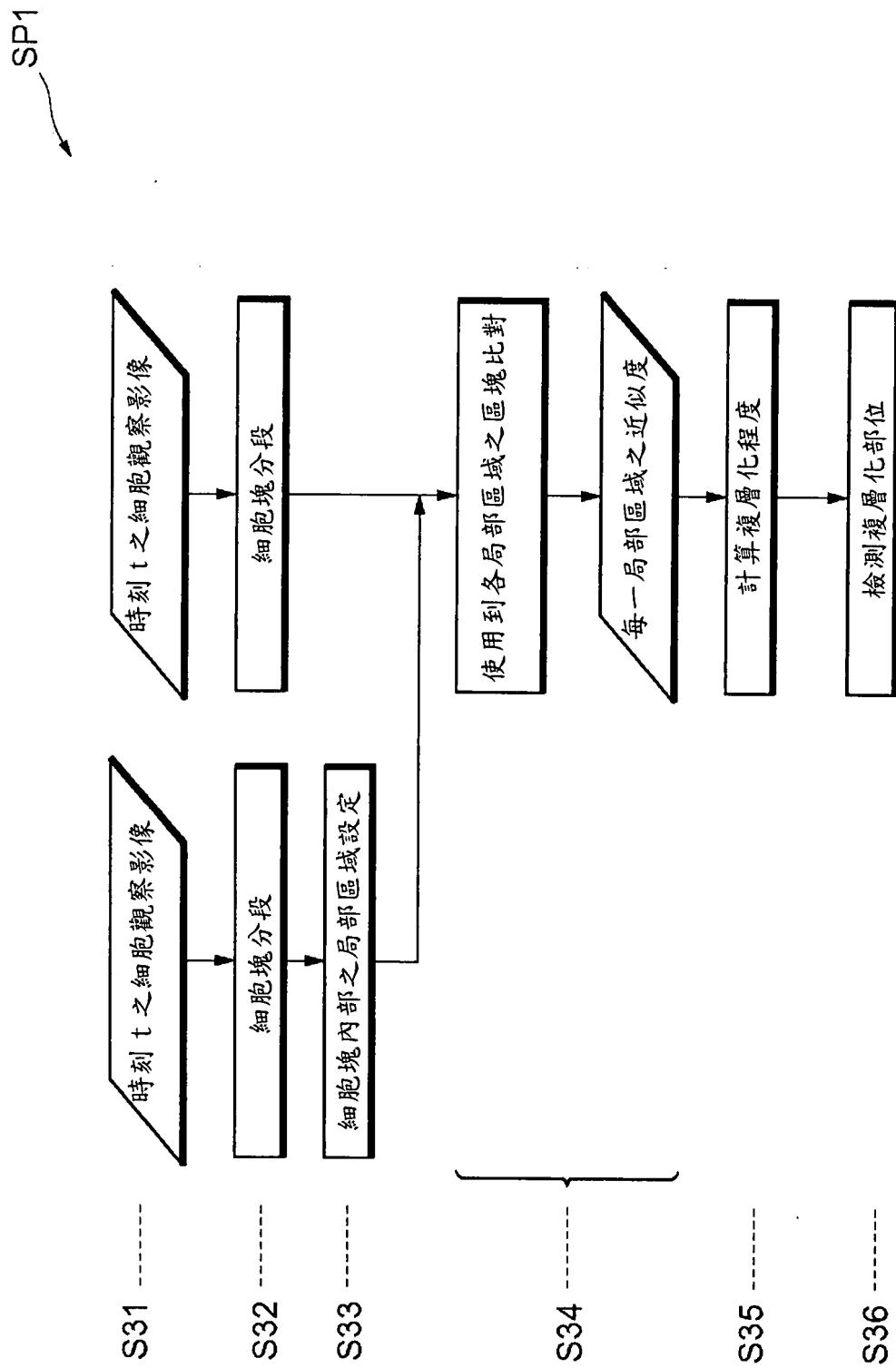
第七圖

201106010



第八圖

201106010



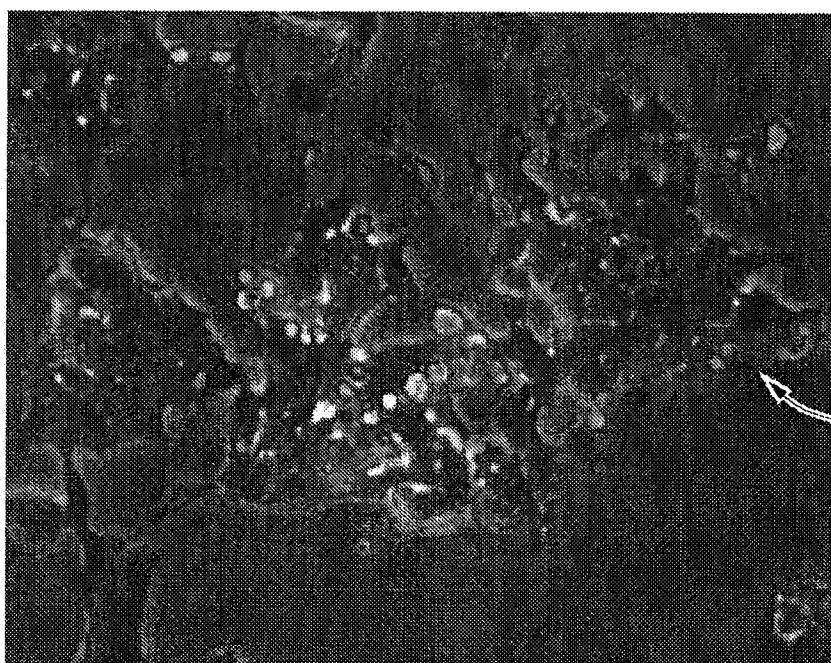
第九圖

201106010

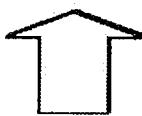
(b)



(a)



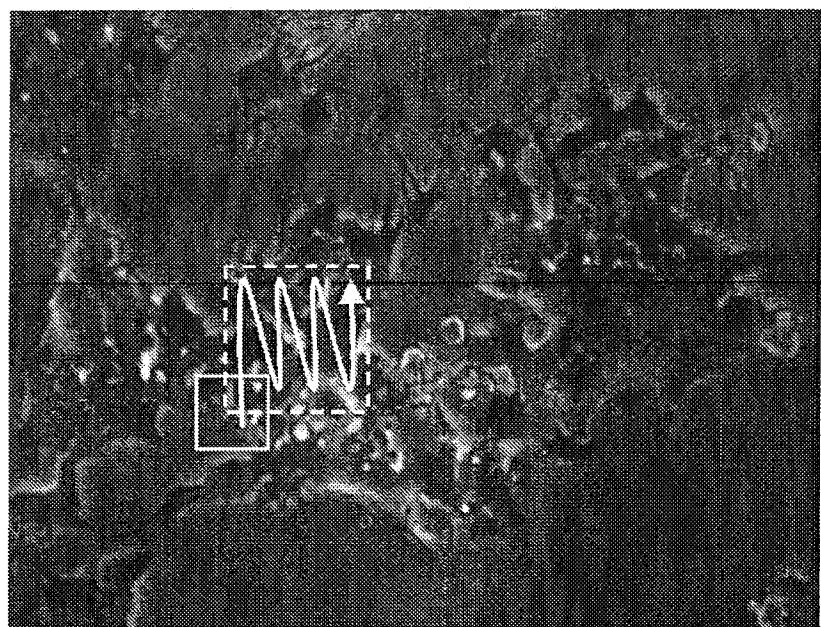
第十圖



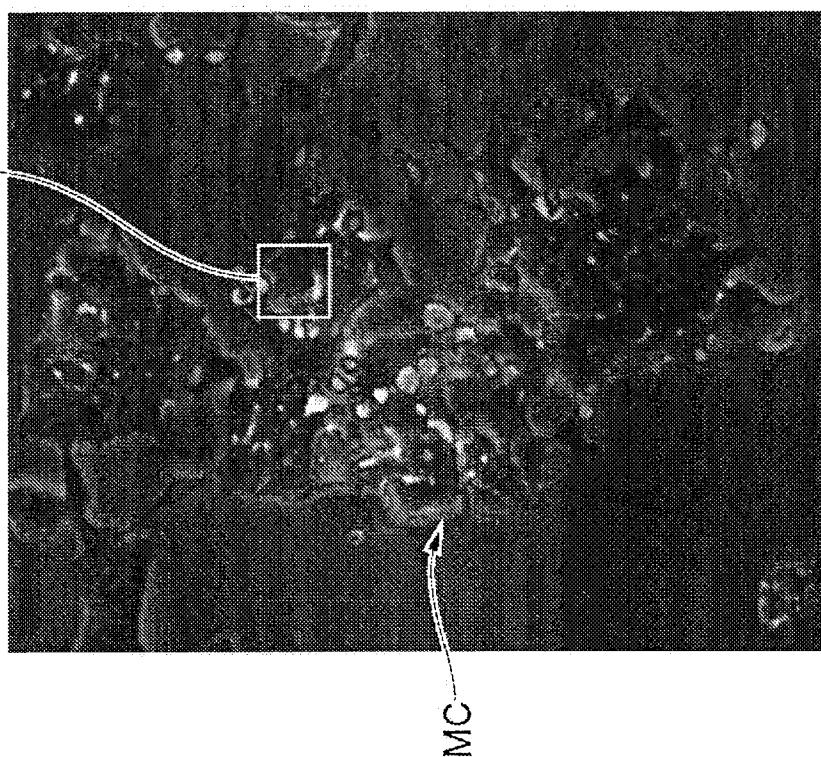
201106010

第十一圖

(b)



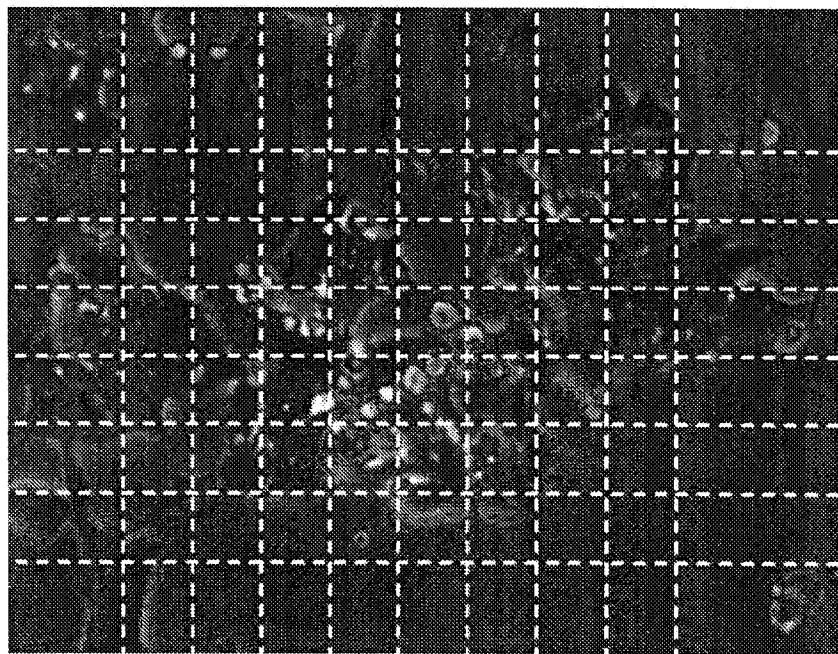
(a)



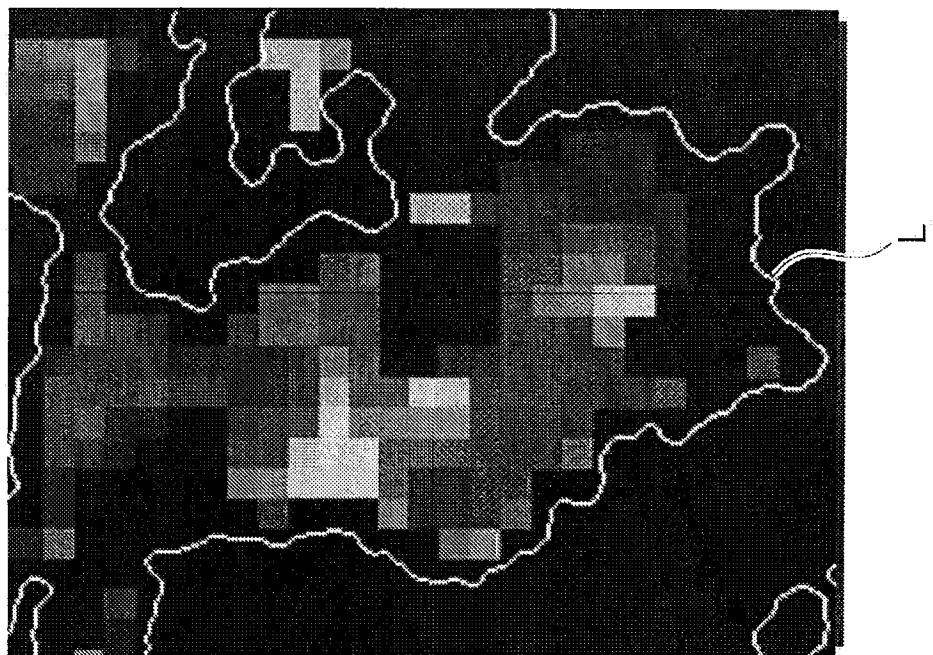
201106010

第十二圖

(a)



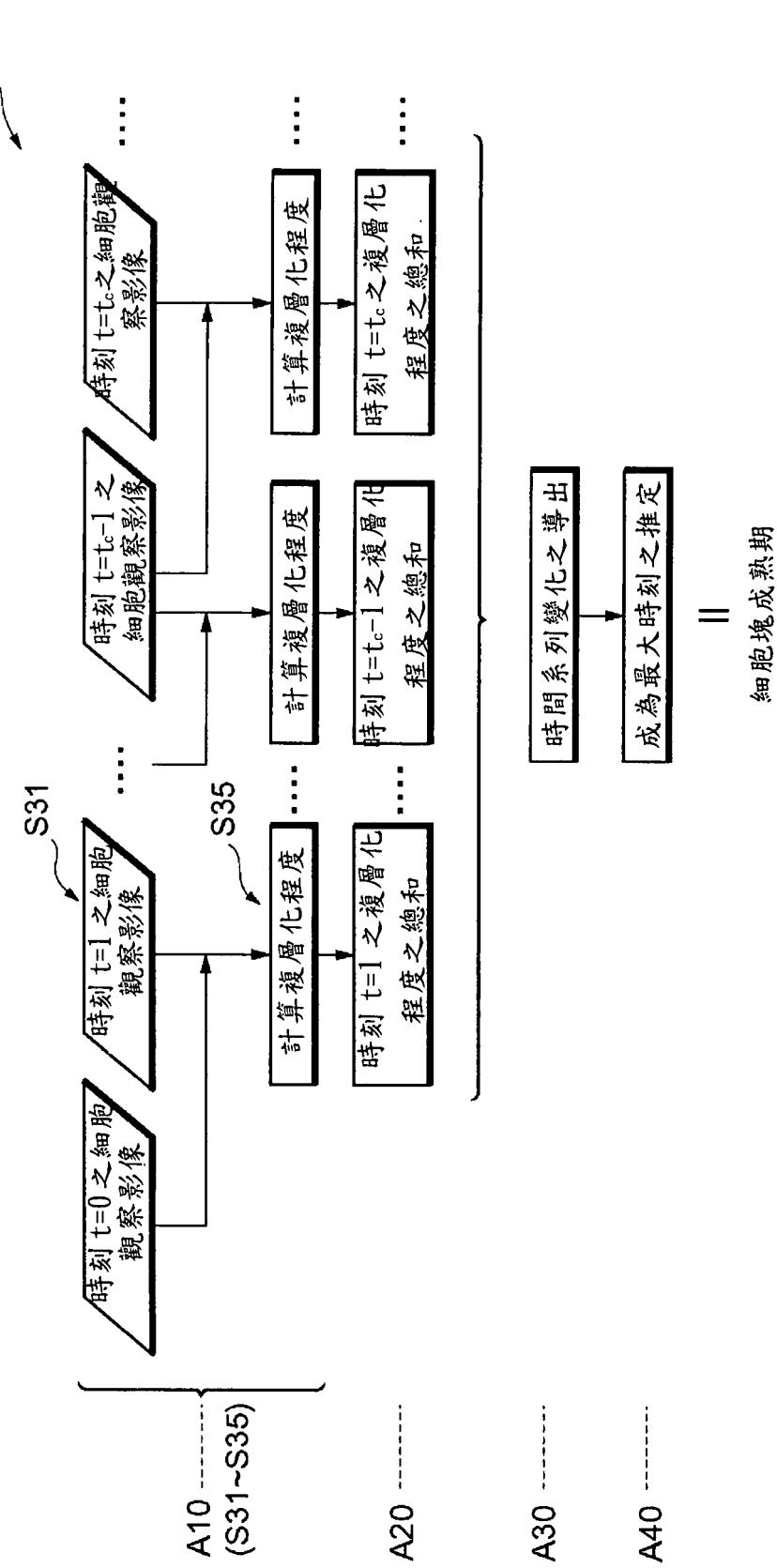
(b)



201106010

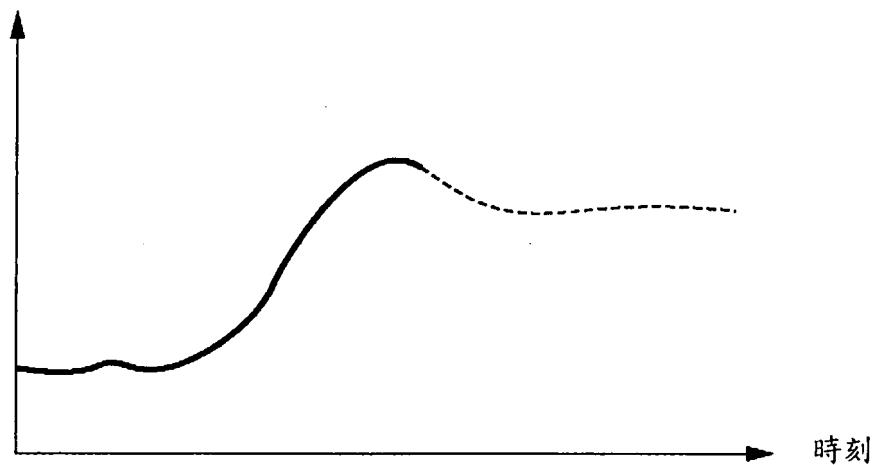
第十三圖

①細胞塊內部複層化程度之總和 時間系列 流程圖



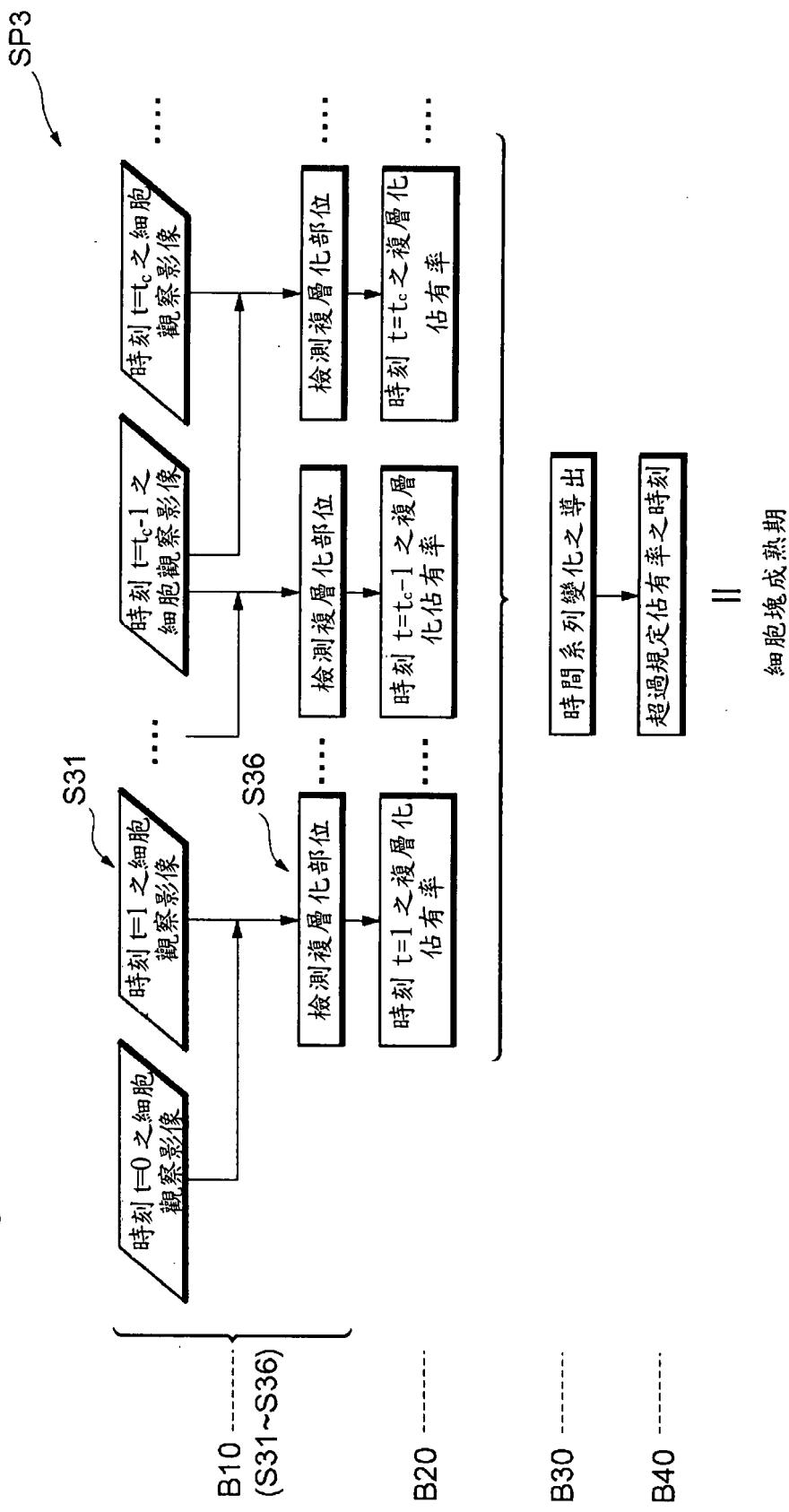
201106010

複層化程度之總和



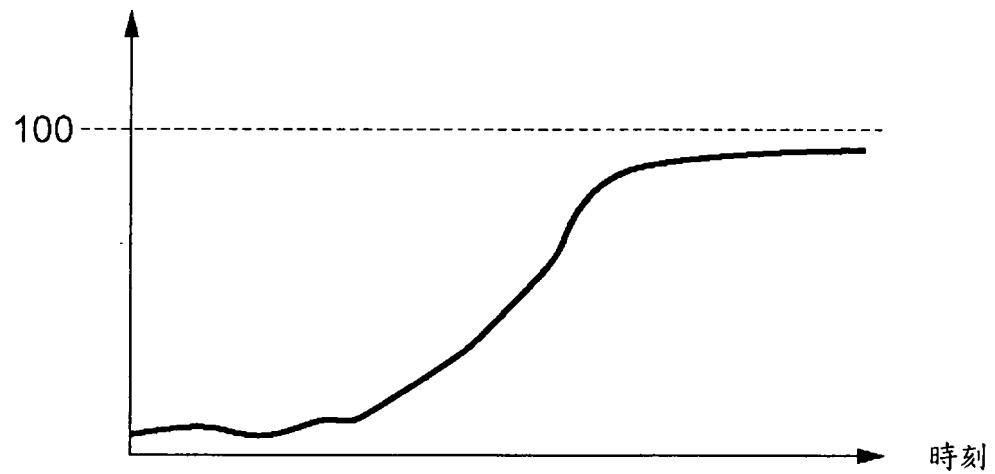
第十四圖

②細胞塊內部之複層化部位之佔有率 時間系列 流程圖



201106010

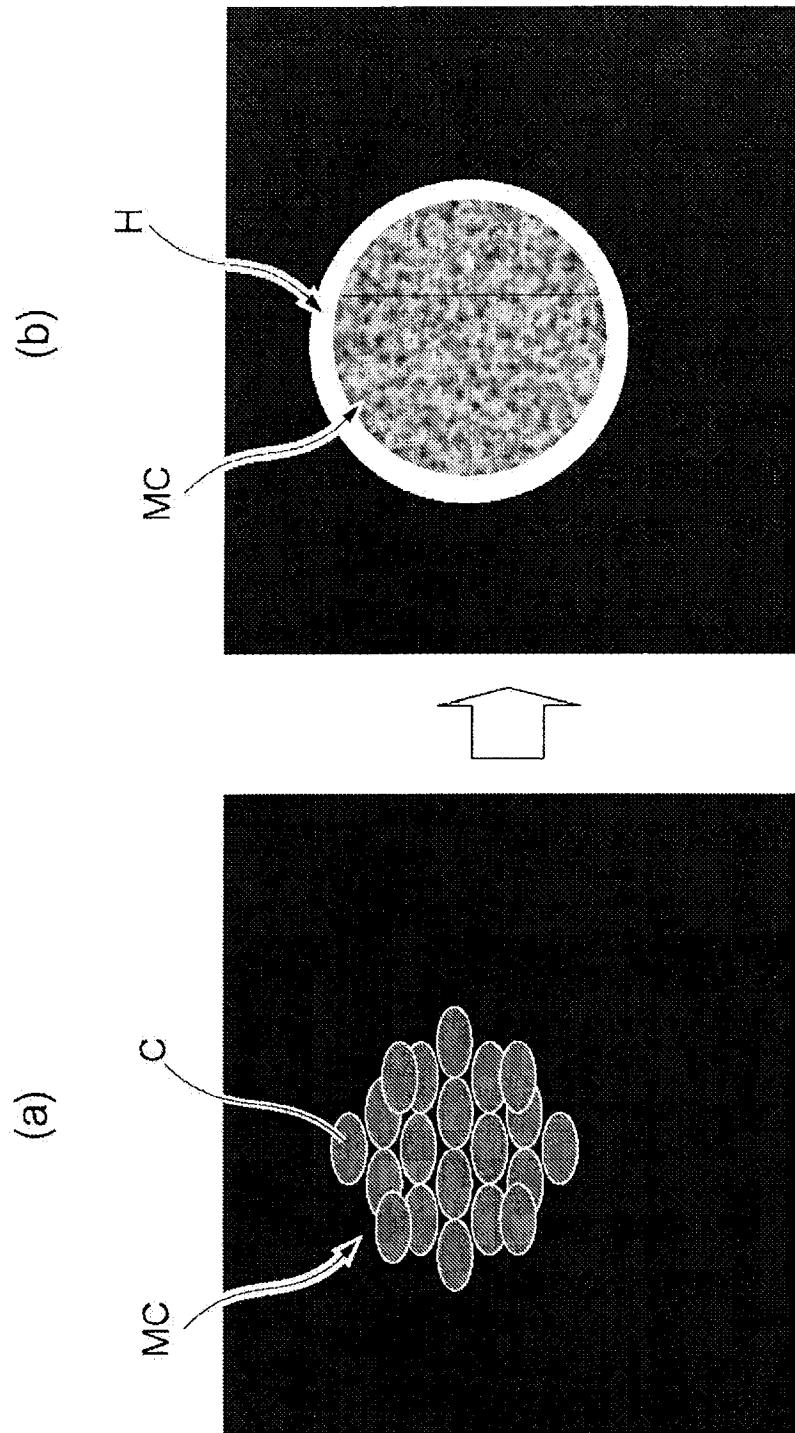
複層化部位之佔有率[%]



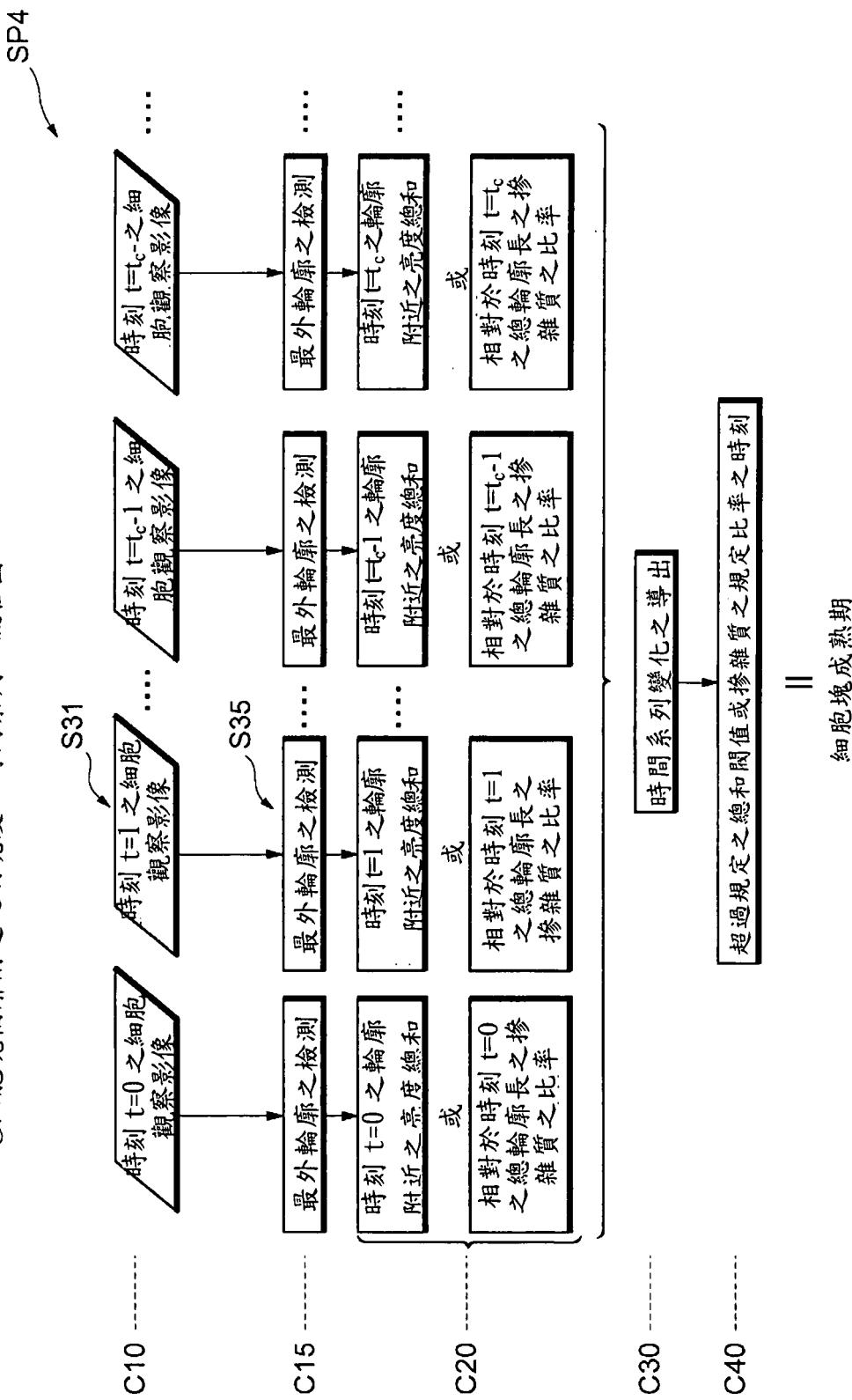
第十六圖

201106010

第十七圖

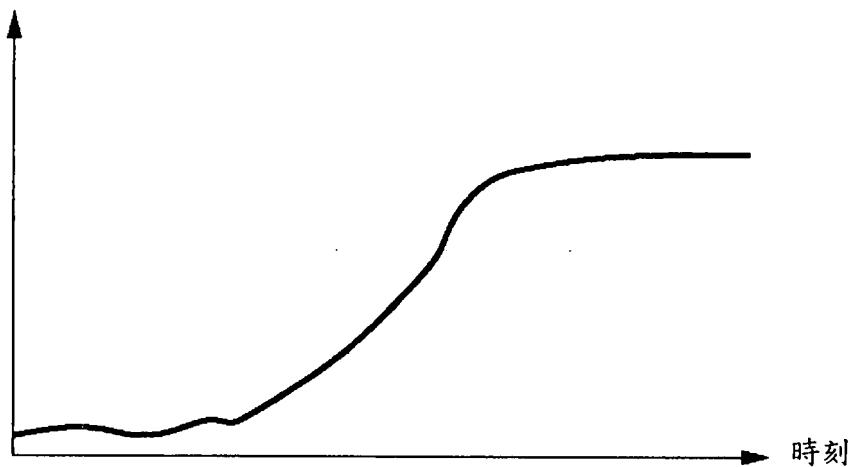


(3)細胞塊輪廓附近之明亮度 時間系列 流程圖



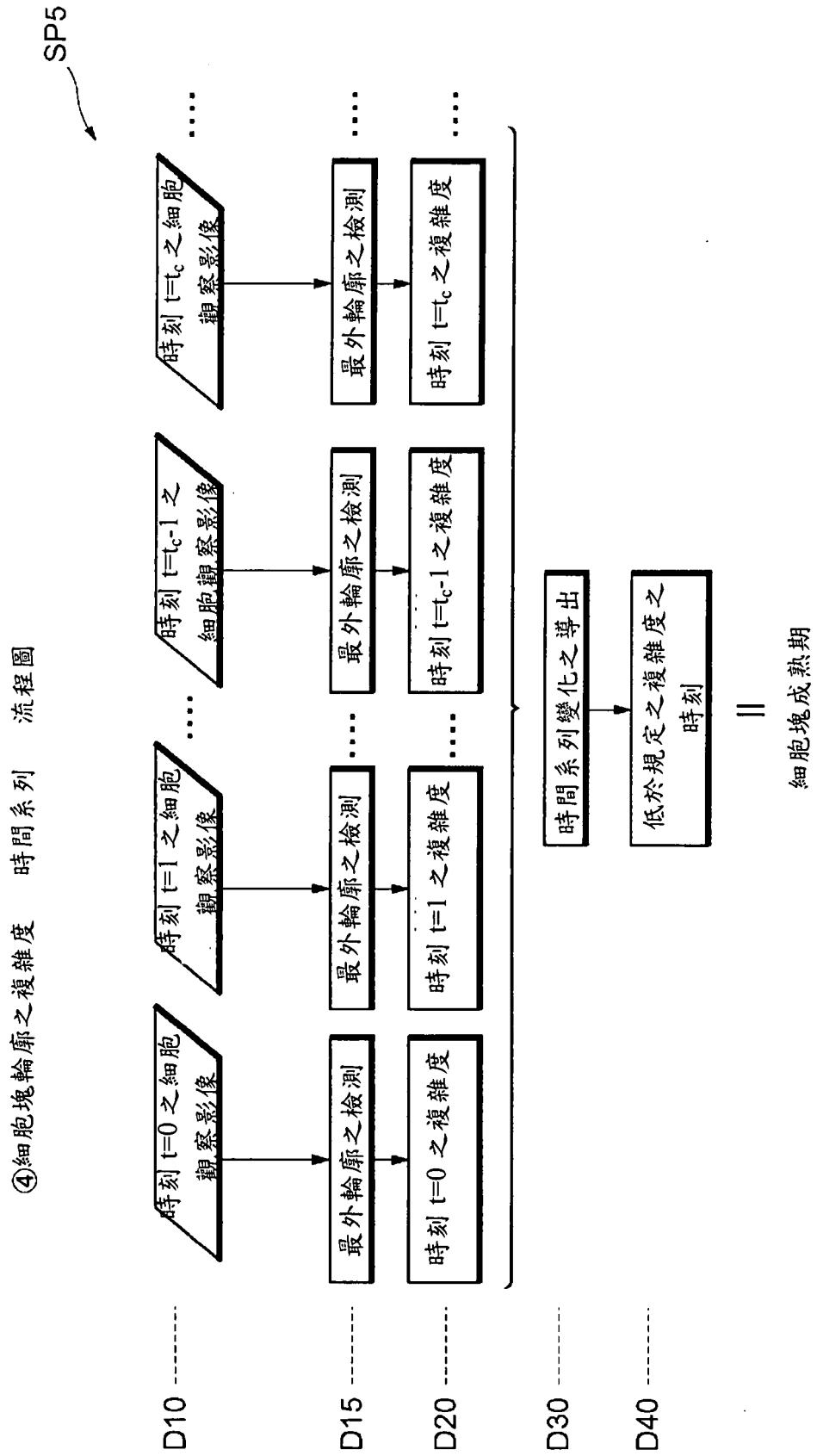
201106010

輪廓附近亮度值之總和



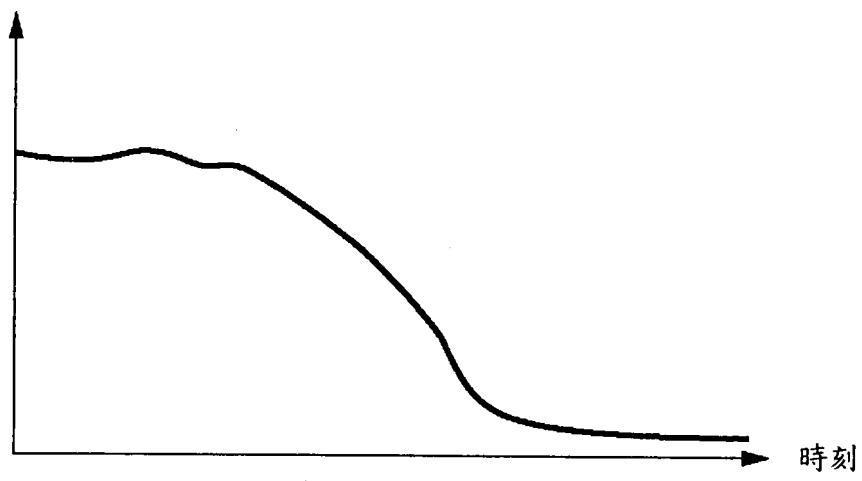
第十九圖

第二十一圖

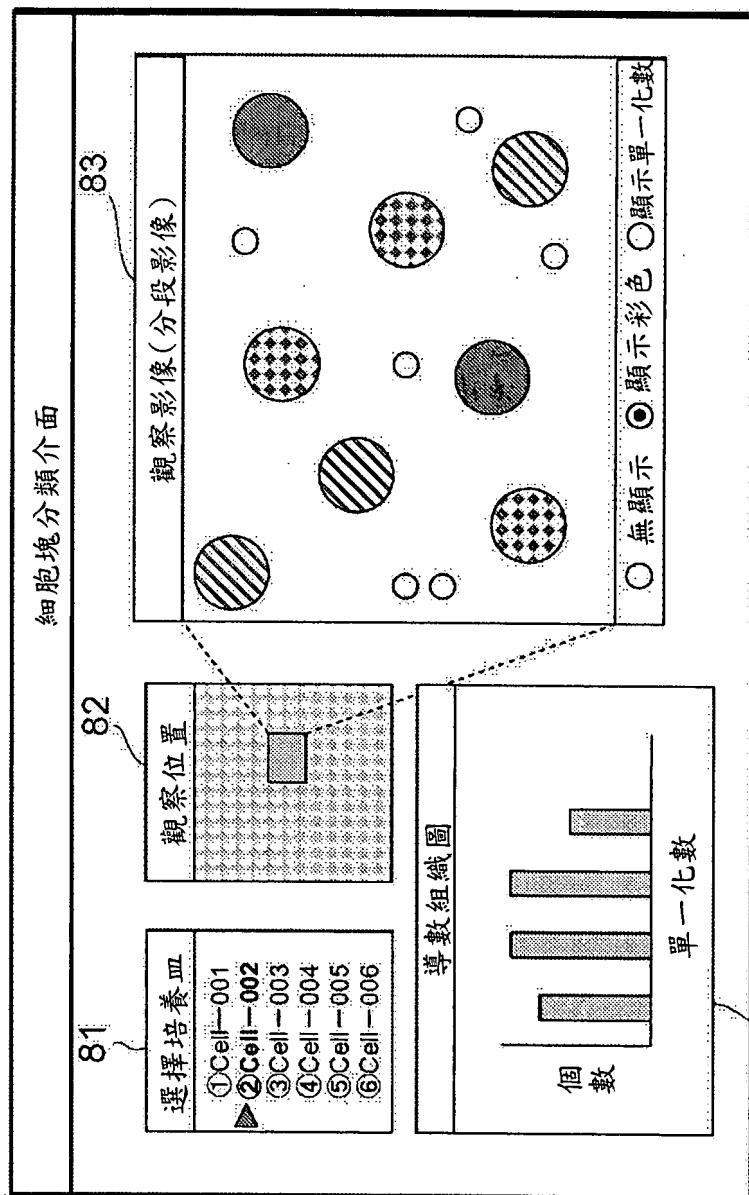


201106010

輪廓之複雜度

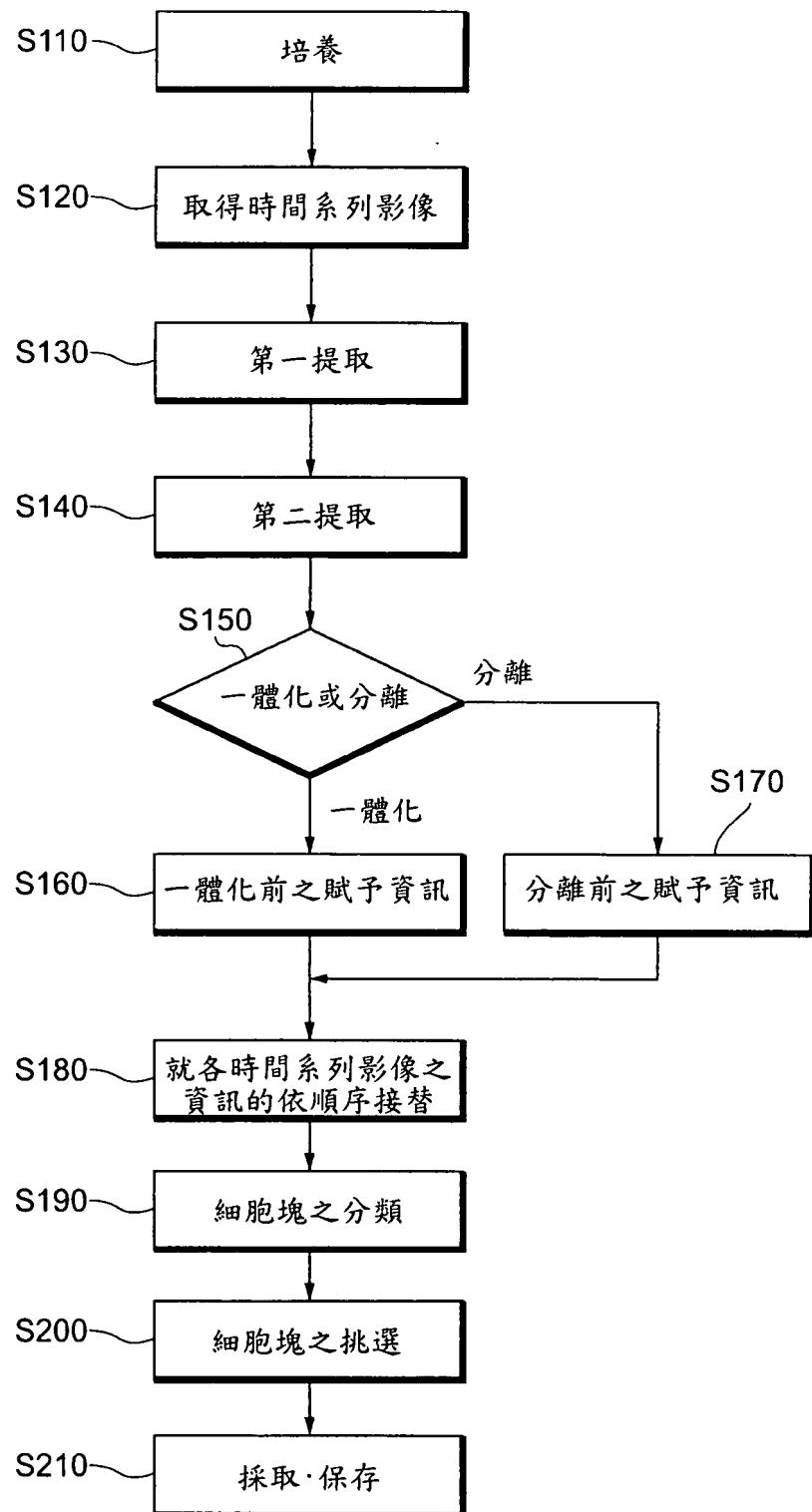


第二十一圖



85

第二十二圖
21/22



第二十三圖

201106010

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（一）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

AP 影像處理程式

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：