

明 細 書

発明の名称：

継代タイミング判定方法、継代タイミング判定システムおよび細胞培養システム

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養における継代タイミング判定方法および判定システムとそれを用いた培養システムに関する。本発明は、特に、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法および判定システムとそれを用いた培養システムに関する。

背景技術

[0002] 幹細胞に代表される細胞の培養では、ディッシュなどの培養容器に投入された培地に細胞を接種して、インキュベータで培養される。接種された細胞は培養容器内の培地の底面の部分の培養面に接着し、一定期間経過すると、細胞の伸展または増殖により培養面を覆っていく。そして、隣接する細胞間の接触が多くなると伸展または増殖が停止する。そのため、不足した空間を補うために、継代すなわち新たな容器に細胞を分散して再接種し、培養を継続する。そのため、効率よく細胞を伸展または増殖させるためには好適なタイミングでの継代が重要となる。一般に、そのタイミングは、培養面において、たとえばコンフルエント状態に対して細胞の占有率が約80パーセントに達した時点であるとされている。そして、従来は、その時点に至ると予想される時期を継代の時期として経験的に設定して継代を行う培養手法がとられてきた。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2005-192485号公報

特許文献2：特開2001-275659号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、細胞の伸展または増殖の速度は細胞ごとに異なり、また細胞を培養容器に接種した際の状態の違いなどにより、継代タイミングは培養容器ごとに個体差が生じる。図6 Aおよび図6 Bは観測箇所Op内の細胞の分布を示した図である。たとえば、図6 Aに示すように、細胞の培養では、細胞間距離の偏りが小さく、細胞を接種した状態から細胞間距離の偏りがないように細胞間距離が平均的に徐々に短くなっていく状態にすることが理想的な培養である。このような理想的な培養において、培養容器内の細胞の占有率が所定値に達した時点が好適な継代のタイミングとなる。この時点の例として、細胞の占有率がコンフルエント状態に対して約80パーセントに達した時点がある。しかし、前記の通り、一般には、細胞の占有率が所定の基準に達したことを判定することなく、経験的に細胞の占有率が所定の基準に達すると推定される時点をもって、継代のタイミングとしていた。この背景には、細胞の占有率を短時間に簡易に把握することの困難性がある。これを解決する技術的手法の例として、特許文献1および特許文献2には、従来経験的に判断されていた継代のタイミングを培地内の細胞の画像データに基づいて客観的に判断する手法が開示されている。

[0005] 特許文献1には、培地の画像データを横切る直線状計測ライン上の細胞のランレングスと培地の単位面積あたりの細胞密度との相関に基づいて細胞密度を計算し、これを所定の判定値とを比較して継代のタイミングを決定する培養状態検出装置が開示されている。しかし、特許文献1では、2次元データとしての画像データは用いるものの、画像データを横切る直線状計測ラインを使用するため、データとしては1次元データであり、培養面の細胞の分布を正確に捉えるには精度が下がる問題があり、この精度の低下は正確な継代のタイミングの把握には悪影響を及ぼす問題がある。

[0006] 一方、特許文献2には、培地内の培養面の細胞の画像データに基づいて、培地における細胞数、細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出して、その算出結果に基づいて継代のタイミングを決定する培養方法およ

び培養装置が開示されている。しかし、特許文献2では、継代のタイミングを判定するにあたり、撮影された細胞の画像データをそれ以前に撮影された細胞の画像データと照合してパターン認識をして差異点を調べ、細胞の伸展または増殖の度合いを計測するものである。また、さらには、その後の継代のタイミングの予測にあたっては、画像データのみならず、培地消費量から継代のタイミングを予測するものである。すなわち、特許文献2では、培養面における所定の複数の地点において、定点観測をするものではなく、さらには培地の消費量から継代のタイミングを予測するため、判定の計算負荷が大きくなる上に、画像以外のシステム構成が大きくなる問題がある。そこで、簡易な構成で、培地の状態を使用することなく、培養面の細胞の画像データのみで適切な継代のタイミングを判定することが求められる。

[0007] また、さらには、図6Bに示すように、培養面内で細胞間距離の偏りが大きい状態の場合などでは、好適な継代のタイミングは、培地における細胞の占有率が約80パーセントに至る前に到来してしまう。しかし、特許文献1および特許文献2は、培養面内での細胞の偏りを把握し、それを継代のタイミングの判定に使用をするものではない。そこで、培養面内での細胞の偏りを把握して適切な継代のタイミングを判定することが求められる。

[0008] また、培養を開始した時点が同じでも、継代のタイミングは培養容器間で必ずしも一致しない。そのため、継代のタイミングを一律に一定の時期に定めると継代として最適なタイミングを逸することになる。そこで、所定の期間ごとに培養容器の細胞の経時的な変化に基づいて継代タイミングの判定を行うとともに、継代のタイミング判定の要素として、所定の複数の地点を抽出して定点観測をして培養面での実際の細胞の状態に応じて適切な継代のタイミングで継代を判定することが求められる。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の一の態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第1撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前

記第1撮影時点における前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第1撮影時点における前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、前記細胞の前記1次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0010] 本発明の他の態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値から経時変化指標値を計算する経時変化計算工程と、を備え、前記判定工程では、前記経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0011] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を

取得する1次情報取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報から経時変化指標値を計算する経時変化計算工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記判定工程では、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0012] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、を計算する1次経時変化計算工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算する2次経時変化計算工程と、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0013] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第1撮影

時点および前記第 1 撮影時点以降の第 2 撮影時点および前記第 2 撮影時点以降の第 3 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得する 1 次情報取得工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、を計算する 1 次経時変化計算工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記 1 次経時変化指標値と、から 2 次経時変化指標値を計算する 2 次経時変化計算工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記 2 次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0014] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、第 1 撮影時点および前記第 1 撮影時点以降の第 2 撮影時点および前記第 2 撮影時点以降の第 3 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得する 1 次情報取得工程と、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、を計算する 1 次経

時変化計算工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値と、から2次経時変化指標値を計算する2次経時変化計算工程と、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法である。

[0015] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点における前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記処理装置は、前記第1撮影時点における前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得して、前記細胞の前記1次情報の統計指標値を計算し、前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

[0016] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取

得し、前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得して前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値から経時変化指標値を計算し、前記処理装置は、前記経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミン
グに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

[0017] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報から経時変化指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記経時変化指標値の統計指標値を計算し、前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミン
グに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

[0018] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の

1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、前記処理装置は、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

[0019] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得し、前

記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記2次経時変化指標値の統計指標値を計算し、前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

[0020] 本発明の更なる態様は、培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次経時変化指標値の統計指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、前記処理装置は、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに

到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システムである。

発明の効果

[0021] 本発明により、細胞の培養において、適切な継代のタイミングの判定が可能となる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1A]本発明の細胞培養システムの外観概略構成を示している。

[図1B]本発明の細胞培養システムの機能ブロック図の一の例を示している。

[図1C]本発明の細胞培養システムの機能ブロック図の他の例を示している。

[図1D]本発明の細胞培養システムの機能ブロック図の更なる他の例を示している。

[図2A]本発明の細胞培養システムにおける培養プロセスのフローの概略を示している。

[図2B]本発明の継代の判定プロセスの処理フローの全体の概略を示している。

[図2C]本発明の継代タイミング判定ユニットの外観概略構成を示している。

[図2D]本発明の継代タイミング判定ユニットの撮像手段の撮影する撮影画像の概念を示している。

[図2E]本発明の継代タイミング判定ユニットにおいて取得する画像の撮影時点についての経時的概念を示している。

[図2F]本発明の第1の実施の形態における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図3A]本発明の第2の実施の形態の第1例における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図3B]本発明の第2の実施の形態の第2例における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図3C]本発明の第2の実施の形態の直近比法における注目撮影時点の選択の概念の一例を示している。

[図3D]本発明の第2の実施の形態の直近比法における注目撮影時点の選択の

概念の他の一例を示している。

[図3E]本発明の第2の実施の形態の基準比法における注目撮影時点の選択の概念の一例を示している。

[図3F]本発明の第2の実施の形態における一例の経時変化指標値の生成の概念を示している。

[図3G]本発明の第2の実施の形態における他の例である経時変化指標値としての比増殖速度と倍加時間の生成の概念を示している。

[図4A]本発明の第3の実施の形態の第1例における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図4B]本発明の第3の実施の形態の第2例における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図4C]本発明の第3の実施の形態の第3例における判定データ生成のプロセスのフローを示している。

[図4D]本発明の第3の実施の形態の直近比法における注目撮影時点の選択の概念の一例を示している。

[図4E]本発明の第3の実施の形態の直近比法における注目撮影時点の選択の概念の他の一例を示している。

[図4F]本発明の第3の実施の形態の基準比法における注目撮影時点の選択の概念の一例を示している。

[図4G]本発明の第3の実施の形態の基準比法における注目撮影時点の選択の概念の他の一例を示している。

[図4H]本発明の第3の実施の形態における1次経時変化指標値および2次経時変化指標値としての差分変化量と変化量率の生成の概念を示している。

[図4I]本発明の第3の実施の形態における1次経時変化指標値としての単位時間変化率および2次経時変化指標値としての変化率差の生成の概念を示している。

[図4J]本発明の第3の実施の形態における1次経時変化指標値としての比増殖速度と倍加時間の概念を示している。

[図5A]本発明の第4の実施の形態の注目撮影時点の選択のバリエーションの概念の一例を示している。

[図5B]本発明の第4の実施の形態の基準値統合法の概念を示している。

[図5C]本発明の第4の実施の形態のマトリックス経時変化法の概念を示している。

[図5D]本発明の第5の実施の形態のマトリックス経時変化法の概念を示している。

[図5E]本発明の第5の実施の形態のマトリックス経時変化法の概念を示している。

[図6A]観測箇所O p内の細胞の分布を模式的に示した図であって、細胞の分布に偏りが無い場合を示している。

[図6B]観測箇所O p内の細胞の分布を模式的に示した図であって、細胞の分布に偏りが大きい場合を示している。

発明を実施するための形態

[0023] [第1の実施の形態]

(細胞培養システム)

図1Aから図2Fを参照して、本発明の第1の実施の形態の継代のタイミング判定の方法およびそのシステムについて説明する。本発明では、培養容器内において、接着性細胞の培養における継代に特に適しているが、必ずしも接着性細胞に限られるものではない。継代のタイミングは、継代タイミング判定システムたる継代タイミング判定ユニット3と、それを有する細胞培養システム1により実現される。以下、継代タイミング判定ユニット3と、細胞培養システム1とを通じて、第1の実施の形態の継代のタイミング判定を説明する。図1Aは細胞培養システム1の外観概略図である。図1Bは、細胞培養システム1の電気的な接続を示した機能ブロック図の一例である。図1Cおよび図1Dは細胞培養システム1の電気的な接続を示した別の機能ブロック図の例を示している。図2Aは本発明の細胞培養システム1の培養継代プロセスのフローの概略を示した図である。図2Bは第1の実施の形態

の継代の判定プロセスのフローを示した図である。

[0024] 細胞培養システム 1 は、たとえば、図 1 B に示すように、培地ユニット 2 と、継代タイミング判定ユニット 3 と、インキュベータたる培養ユニット 4 と、細胞接種装置 5 と、移送ユニット 6 と、遠心装置 7 と、処理装置 8 と、の内部ユニットを備える。細胞培養システム 1 は、必ずしも、これらのユニットのすべてを備えている必要はなく、少なくともこれらのユニットの一部を備える態様であってもよい。

[0025] 細胞培養システム 1 内では、処理装置 8 が細胞培養システム 1 を構成するユニット群（培地ユニット 2 と、継代タイミング判定ユニット 3 と、培養ユニット 4 と、細胞接種装置 5 と、移送ユニット 6 と、遠心装置 7）と信号の授受が可能なように、これらのユニット群と処理装置 8 とが電氣的に接続されている。培地ユニット 2 は培養容器の中に培地を投入し、また培地交換のための古い培地の除去回収と新たな培地の投入を行う装置である。継代タイミング判定ユニット 3 は培養容器の継代のタイミングの判定を行う装置であって、内部に撮像手段たるカメラ 31 を備えている。培養ユニット 4 は培養容器を内部の室に培養容器を保管して、その室内を所定の温度に保つ装置である。細胞接種装置 5 は、初期にまたは継代の際に、たとえば培養容器内に細胞混濁液を滴下して細胞を接種する装置である。移送ユニット 6 は培養容器を前記ユニット群間で移動させる装置である。遠心装置は、培養容器の継代の際に、培養容器から剥離した細胞を回収するための分離を行う装置である。

[0026] 処理装置 8 は、たとえば図 1 B のように、処理装置 8 は、培地ユニット 2 と、継代タイミング判定ユニット 3 と、培養ユニット 4 と、細胞接種装置 5 と、移送ユニット 6 と、遠心装置 7 とのそれぞれの動作を制御するように、それぞれに対して、それぞれを制御するための制御信号を送信する。また、処理装置 8 は、培地ユニット 2 と、継代タイミング判定ユニット 3 と、培養ユニット 4 と、細胞接種装置 5 と、移送ユニット 6 と、遠心装置 7 とのそれぞれから、それぞれの状態の信号を受信する。

[0027] 処理装置 8 は、本発明の細胞培養システム 1 を構成するユニット群（培地ユニット 2、継代タイミング判定ユニット 3、培養ユニット 4、細胞接種装置 5、移送ユニット 6、遠心装置 7）の制御を行い、これに必要な信号の受信および発信をする。また、これに加えて、各ユニットにおいて検出されたデータの信号を受信することもできる。すなわち、培地ユニット 2 や継代タイミング判定ユニット 3 等において、検出されたデータ（たとえば細胞数など）を受信することもできる。また、処理装置 8 は、後述するように、特に継代タイミング判定ユニット 3 などにおいて、各ユニットのデータの処理を行って、必要な判断を行うこともできる。

[0028] 続いて、図 2 A を参照して、各ユニットの概略の機能と本発明の培養継代プロセスとを説明する。まず、STEP 1 である細胞接種プロセスにおいて、評価培養容器 P e 内に細胞を含む培地を形成する。すなわち、ここでは、細胞接種装置 5 により、評価培養容器 P e 内に細胞が含まれる細胞懸濁液を投入するか、または評価培養容器 P e 内に培地を投入してその中に細胞を接種する。たとえば、ディッシュやシャーレなどの平たい培養容器に分注機 21 の分注管 21 a を使用して細胞懸濁液を投入するか、または培地を投入した後細胞懸濁液を培地に投入して評価培養容器 P e を作製する。

[0029] STEP 1 で細胞が接種された評価培養容器 P e は、STEP 2 である培養プロセスとして、培養ユニット 4 内の棚 41 に載置されて、恒温状態で所定の期間保存される。この期間に評価培養容器 P e 内の細胞は評価培養容器 P e の底部に接着されて培地を含む評価培養容器 P e 内で伸展または増殖する。評価培養容器 P e は、所定の期間が経過したときに、STEP 3 である継代タイミング判定プロセスを行う。処理装置 8 は、その所定の期間のタイミングカウントを行い、移送ユニット 6 に判定の対象となる評価培養容器 P e を培養ユニット 4 から取り出して、評価培養容器 P e を継代タイミング判定ユニット 3 に移送するように、制御信号を送る。

[0030] STEP 3 では、評価培養容器 P e を培養ユニット 4 から取り出して継代タイミング判定ユニット 3 に移送し、継代タイミング判定ユニット 3 で評価

培養容器 P e の培地を撮影して継代のタイミングに到達しているかを判定する。ここで、評価培養容器 P e が継代のタイミングに到達していないと判定されれば、STEP 2 の培養プロセスに戻る。継代のタイミングに到達していると判定されるまでは、STEP 2 と STEP 3 とを繰り返して実行する。STEP 2 の培養プロセスにおいて、継代のタイミングの判定の時期には至っていないものの、培地の交換が必要になった場合には、必要に応じて、STEP 4 で培地ユニット 2 により培地の交換を行い、STEP 2 の培養プロセスに戻る。また、継代のタイミングの判定の結果、継代のタイミングには達していないが培地の交換が必要な場合にも、STEP 4 で培地ユニット 2 により培地の交換を行った上で、STEP 2 の培養プロセスに戻る。一方、継代タイミング判定プロセスで、評価培養容器 P e が継代のタイミングに到達したと判定されれば、STEP 5 である継代プロセスに移行する。STEP 5 の継代プロセスでは、たとえば以下のプロセスとして実行できる。まず評価培養容器 P e 内の細胞を取り出して回収し、取り出した細胞を含む細胞懸濁液を調整して、細胞接種装置 5 により新しい評価培養容器 P e 内に細胞懸濁液を投入して細胞の播種を行う。細胞懸濁液の調整の際には、必要に応じて細胞を分離するために遠心装置 7 を利用する。新たな評価培養容器 P e に細胞が播種されれば継代は完了する。継代後には、また STEP 2 の培養プロセスに戻り、STEP 2 から STEP 5 を必要に応じて繰り返す。

[0031] STEP 1 から STEP 5 までの各 STEP 間において、培地ユニット 2、継代タイミング判定ユニット 3、培養ユニット 4、細胞接種装置 5 の間の評価培養容器 P e の移送は移送ユニット 6 が行う。移送ユニット 6 は、たとえば昇降レールに沿って移動する移動台 6 1 に、伸縮可能なアーム 6 2 が取り付けられていて、各ユニットの前まで移動して、各ユニット内において評価培養容器 P e の出し入れが可能である。アーム 6 2 の先端には評価培養容器 P e を把持可能なアクチュエータ 6 3 を有している。

[0032] 処理装置 8 は、たとえば、細胞培養システム 1 を構成するユニット群（培地ユニット 2、継代タイミング判定ユニット 3 等）の統括的な制御を司るよ

うに、各ユニット群の外部に、図 1 B のように、配置される。しかし、処理装置 8 に加えて、または処理装置 8 に変えて、各ユニットの制御およびデータ処理について、各ユニット内に、内部プロセッサとして配置することもできる。この態様では、プロセッサを配置したユニットを他のユニットと独立して機能させることが可能となる。たとえば、継代タイミング判定ユニット 3 の場合では、継代タイミング判定ユニット 3 の制御およびデータ処理に特化するように、継代タイミング判定ユニット 3 内に、その処理を行う機器を配置してもよい。継代タイミング判定ユニット 3 を他のユニットと独立させて使用することができる。

[0033] すなわち、この例では、処理装置 8 は、図 1 C のように、継代タイミング判定ユニット 3 内に内部プロセッサたる処理装置 3 3 として配置し、処理装置 3 3 が、処理装置 8 の代わりに、継代タイミング判定ユニット 3 の制御およびデータ処理を行うようにすることができる、これにより、継代タイミング判定ユニット 3 を他のユニットと独立して機能させることが可能となる。

[0034] また、さらに、処理装置 3 3 は、図 1 D に示すように、物理的かつ外観的には継代タイミング判定ユニット 3 と認識されるような継代タイミング判定装置 3 a の外部、かつ物理的かつ外観的に細胞培養システム 1 と認識されるような細胞培養装置 1 a の外部に、存在させることもできる。この場合、処理装置 3 3 は、通信手段およびネットワーク N を介して継代タイミング判定装置 3 a と通信可能に接続される。たとえば、継代タイミング判定装置 3 a は通信手段およびネットワーク N を介して撮像手段たるカメラ 3 1 と接続される。この場合には、ネットワーク N と処理装置 3 3 はクラウドとして構成される場合も含む。この例では、処理装置 3 3 が見かけ上の（物理的に、外観的に）継代タイミング判定装置 3 a や細胞培養装置 1 a の外部に存在していたとしても、実質的（電氣的、システムの）には継代タイミング判定ユニット 3 が処理装置 3 3 を含む形態である。また、細胞培養システム 1 が継代タイミング判定ユニット 3 を含めば、細胞培養システム 1 は実質的なシステム構成上は図 1 C の構成と同じ構成となる。これにより、処理装置 3 3 を、

カメラ 31 が配置される継代タイミング判定装置 3a と離して配置することが可能となり、外部からの継代タイミング判定装置 3a における処理および制御が可能となる。

[0035] 続いて、以下、継代タイミング判定ユニット 3 が行う継代タイミング判定について、説明する。ここでは継代タイミング判定ユニット 3 内に処理装置 33 を配置する例（図 1C の構成）で説明するが、前記の通り継代タイミング判定ユニット 3 内に処理装置 33 を配置せずに、継代タイミング判定ユニット 3 の外部に配置される処理装置 8 で、その処理を実行する場合も、これと同様である。この場合には、処理装置 33 が行う下記の機能を処理装置 8 に持たせればよい。

[0036] （継代タイミング判定ユニット）

続いて、図 2B を参照して、前述の STEP 3 である継代タイミング判定ユニット 3 および継代タイミング判定方法における継代判定プロセスについて説明する。継代判定プロセスは、まず細胞画像の取得をする撮像工程（S11）と、その細胞画像から判定データを作成する判定データ作成工程（S12）と、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程（S13）とからなる。

[0037] まず撮像工程（S11）では、評価培養容器 Pe の細胞の画像を撮影する。図 2C は継代タイミング判定ユニット 3 の外観概略構成を示している。継代タイミング判定ユニット 3 は、撮像手段たるカメラ 31 と撮影ステージ 32 と、処理装置 33 を備えている。撮影ステージ 32 の上には、評価培養容器 Pe を配置することが可能であって、カメラ 31 は評価培養容器 Pe の培地の面を撮影可能である。移送ユニット 6 のアーム 62 により移送された評価培養容器 Pe 内の培地の面の所定の箇所がカメラ 31 により撮影されて画像として取得される。取得された画像のデータは記憶装置（不図示）に格納される。

[0038] 処理装置 33 は、判定データ作成工程（S12）と判定工程（S13）とを実行する。処理装置 33 は、撮像工程（S11）によって取得された画像

を取得し、またその画像から得られるデータを処理して継代のタイミングを判定する。これらについて、図2Cから図2Fを参照して、以下に、具体的に説明する。

[0039] (撮像工程)

まず、撮像工程(S11)では、カメラ31は、細胞培養システム1の培養ユニット4内のすべての評価培養容器Peに対して、培地の培養面の細胞の画像を撮影して細胞画像として取得する撮像工程を実行する。本明細書では、「培地」は評価培養容器Peの底面部の面内方向を指し、培養面は容器の培地内の深さ方向の細胞が固着している部分を指すものと定義する。培養ユニット4から判定対象となる一の評価培養容器Peを移送ユニット6のアーム62で取り出し、移送ユニット6により継代タイミング判定ユニット3内に移送する。移送された評価培養容器Peは、継代タイミング判定ユニット3の撮影ステージ32の上に載置される。載置された評価培養容器Peの培地がカメラ31により撮影される。撮影が終了した評価培養容器Peは移送ユニット6のアームにより撮影ステージ32から回収され、移送ユニット6により培養ユニット4内に回送される。撮像工程では、さらにこれを繰り返して、培養ユニット4の内部の判定対象であるすべての評価培養容器Peに対して培養面の細胞の画像の撮影を実行することも含む。

[0040] 図2Dはカメラ31である評価培養容器Peの培地の培養面を撮影したときの画像の概念図である。撮像工程では、たとえば、図2Dに示すように、カメラ31により、ある評価培養容器Peの培地の培養面が撮影され、細胞画像として継代タイミング判定ユニット3の記憶装置に取りこまれる。図2Dでは、例として、たとえば6×6枚(36枚)の撮影を行っている概念を示している。ただし、実際には、これよりも細かい分割での撮影を行う。撮影する培地の箇所は、評価培養容器Peの全域の中から選択される一部の領域であって、少なくともその評価培養容器Peの培養面の評価に適するように評価培養容器Peの状態を代表するものとして決定される所定の複数の観測箇所Opの培地の箇所である。たとえば、図3Bでは、評価培養容器Pe

を代表する箇所为例として、ハッチング箇所の3枚の画像の領域を観測箇所Opとしている。観測箇所Opは、まず初期的に、ある評価培養容器Peの培地の全領域を撮影し、そこで細胞の数等が評価培養容器Peを代表するに足りる画像領域の箇所を選定し、その画像領域の箇所を定点の観測箇所として決定される。観測箇所Opは、代表的には3箇所、10箇所というように複数の箇所が選定されて決定される。複数の箇所にすることで、一般的には判定精度は向上すると理解される。一旦、決定された観測箇所Opは、以下説明する経時的な変化をみるための継代タイミング判定のプロセスにおいて、任意の一の評価培養容器Peについては、異なる時点における撮影においても、同じ観測箇所Opが使用される。以下、任意の一の評価培養容器Peを代表例として説明するが、複数の評価培養容器Peのいずれについても同様である。

[0041] 図2Eは、複数の撮影時点で撮像工程が実行される概念を示している。撮像工程(S11)では、このように、任意の一の評価培養容器Peの観測箇所Opについて、培養が進むにしたがって、所定の時間間隔の複数の撮影時点において、培養面の細胞の画像を撮影して細胞画像として取得する。各撮影時点では、評価培養容器Peの培地から選択される所定の複数の観測箇所Opにおいて培養面の細胞を撮影して細胞画像を取得する。すべての撮影時点において、定点観測となるように観測箇所Opは同じ箇所を選定する。各撮影時点において、培養ユニット4から判定対象の評価培養容器Peが移送ユニット6で取り出されて継代タイミング判定ユニット3に移送され、その撮影終了後にその評価培養容器Peが培養ユニット4に移送される。培養が進むにつれて、新たな撮影時点が到来したときに、その撮影時点で撮像工程(S11)を行い、代表例では撮像工程(S11)を行う度に、以下で説明する判定データ作成工程(S12)と判定工程(S13)とを実行する。

[0042] 第1の実施の形態では、複数回の撮影時点から選択される1回の撮影時点で撮影された細胞画像のみを使用して、継代のタイミングの判定を行う。本明細書では、継代のタイミングの判定に使用する撮影時点を目録撮影時点と

よぶ。第1の実施の形態の注目撮影時点は評価撮影時点のみからなる。第1の実施の形態では、継代のタイミングの判定において、図2Eの注目撮影時点としての第1撮影時点のみで撮影された細胞画像を使用する。後述するが、継代のタイミングの判定において、第2の実施の形態では複数回の撮影時点から選択される2回の注目撮影時点で撮影された細胞画像を使用し、第3の実施の形態では3回以上の複数回の注目撮影時点から選択された細胞画像を使用する。図2Eにおいて、第3の実施の形態の注目撮影時点について、代表例として、3回の注目撮影時点から選択された細胞画像を使用するように表している。

[0043] (判定データ作成)

撮像工程(S11)に続いて、以下、判定データ作成工程(S12)において、継代判定のための判定データの作成を行う。図2Fは第1の実施の形態における判定データ作成工程(S12)を構成する各工程を示している。第1の実施の形態における判定データ作成工程(S12)は、図2Fに示すように、撮像工程(S11)で取得した細胞画像から1次情報を取得する1次情報取得工程(S1201)と、それに引き続いて実行される1次情報から統計指標値を計算する統計指標値取得工程(S1202)とからなる。

[0044] (1次情報取得)

1次情報取得工程(S1201)では、処理装置33は、選択された1つの撮影時点(注目撮影時点)で取得された画像から、1次情報を取得する。1次情報は各撮影時点で撮影されて取得した培養面の細胞画像のそれぞれの中に撮影されている細胞に関する情報である。1次情報は、たとえば細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間の相対距離等である。1次情報は、各撮像工程において撮影された画像から、市販されている等、一般に利用可能なソフトウェア等を使用することで取得することができる。1次情報のうち、細胞数は、撮影された画像に撮影されている細胞の数であって、直接的に取得可能な細胞数を意味する。たとえば、細胞密度は、取得された細胞数を撮影している箇所の面積で除して計算される密度である。

ここで使用される面積は、様々な面積を採用することができ、培地のうち泡などの不純物や撮影に失敗した画像の部分など、細胞に関する情報として寄与することができない部分を排除した面積であって、細胞が伸展または増殖可能な領域に対応する実効的な有効面積とすることができる。また、その面積のうち、全細胞が占めている細胞の大きさの総和面積が占有面積であり、細胞の単体面積は画像に撮影されている各細胞の面積である。細胞の単体の専有面積は、画像に撮影されている個々の細胞の大きさであって、たとえば一の細胞画像の細胞間の相対距離は、画像内に撮影されている細胞の内、2以上の細胞によって定義される距離である。各撮影時点で取得された画像から取得される1次情報から、継代のタイミングを判定することができる。

[0045] (統計指標値取得)

1次情報取得工程(S1201)では、1つの撮影時点で取得された1次情報を取得した後に、統計指標値取得工程(S1202)を実行する。ここでは、1つの撮影時点で取得された1次情報から、その撮影時点に対応する統計指標値を計算する。1次情報の状態の傾向を示す基礎データとして、さらに各1次情報の統計指標値を計算する。統計指標値は、各画像において複数の値をとるために1次情報を代表的に表す代表値として画定される指標値であって、たとえば総和数、平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。すなわち、1次情報の統計指標値は、複数の観測箇所Opにおいて撮影された各画像から取得できる値についての総和(合計値)、各画像における平均値、または分散、偏差である。たとえば、1次情報が細胞数の場合、ある撮影時点における観測箇所Opが3箇所の場合には、3箇所の画像の細胞数の総和、または細胞数の平均値、分散または標準偏差のいずれかである。これらの1次情報および1次情報の統計指標値は、取得されたデータとして必要に応じて、記憶手段(不図示)に格納される。

[0046] ここで、統計指標値として選択される平均値および総和と、分散および偏差とは、その定義から、細胞の継代の指標として、異なる技術的特徴を有している。統計指標値としての総和および平均値は細胞数の増加および細胞の

伸展または増殖とその鈍化を示す指標である。総和および平均値は複数の観測箇所 O_p のそれぞれにおける総和および平均値として観測箇所 O_p 分の個数の統計指標値として総和および平均値とすることができる。さらに、それを平均化など統計的な処理により 1 の代表値、または取り扱い易い数の観測箇所 O_p 分の個数より少ない数の代表値としてもよい。一方、統計指標値としての分散または偏差は容器内での細胞の均一性を示す特徴を有している。分散または偏差は複数の観測箇所 O_p のそれぞれにおける分散または偏差として観測箇所 O_p 分の個数の統計指標値として分散または偏差とすることができる。さらに、それを平均化するなど統計的な処理により 1 の代表値、または取り扱い易い数の観測箇所 O_p 分の個数より少ない数の代表値としてもよい。細胞の培養では、一般に、細胞の伸展または増殖により細胞の均一性は悪化する。そして、細胞数の限界による継代のタイミングよりも前に、細胞の不均一性による継代のタイミングのほうが早く到来する。すなわち、統計指標値として総和または平均値を選択する場合には、未だ継代のタイミングに至っていないくても、培養容器内の細胞が不均一となることが多い。この場合には、一部においては、すでに細胞の伸展または増殖に限界の箇所が出ていることになり、継代を行うべき好適なタイミングといえる。統計指標値としての分散または偏差は培養容器内の細胞の均一性の指標であるので、統計指標値として総和または平均値を選択するよりも好適に継代のタイミングの判定を行うことができる。統計指標値としての総和および平均値と分散および偏差との特徴は、以下に説明する第 2 の実施および第 3 の実施の形態でも同様である。

[0047] (継代判定)

判定データの作成が完了した後は、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程 (S 1 3) を実行する。判定工程 (S 1 3) では、判定データ作成工程 (S 1 2) で作成した統計指標値に基づいて、継代のタイミングの判定を行う。統計指標値は、培養容器内から選択される所定の複数の地点における所定の観測箇所 O_p の培養面の細胞の状態を定量的に示している

。したがって、所定の観測箇所O pの箇所における統計指標値としての総和は、細胞数を例にとれば、それぞれ所定の観測箇所O pの領域内における細胞の全数であり、培養容器内の培養面の観測箇所O p以外の箇所を含む全域の細胞の総数を代表する値となる。統計指標値としての平均値は、細胞数を例にとれば、たとえば単位面積当たりの細胞数または一か所の観測箇所O pあたりの細胞数とすることができ、総和以上に培養容器内で細胞が伸展または増殖できる余地を示す代表値となる。

[0048] 判定工程（S 1 3）において、統計指標値取得工程（S 1 2 0 2）で計算された統計指標値と所定の閾値とを比較する。ここで、判定データが所定の閾値に至ったときを継代のタイミングに至ったものと判定する。所定の閾値は、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、継代のタイミングとなる時点における統計指標値を取得し、これを所定の閾値として画定する。

[0049] 統計指標値としての総和および平均値は、細胞を接種した状態から細胞間距離の偏りがないように細胞間距離が平均的に徐々に短くなっていくような理想的な培養状態において、継代のタイミングを判定する場合に非常に効果的である。統計指標値としての総和および平均値が選択された場合には、統計指標値としての総和または平均値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとして判定を行う。観測箇所O pの面積部分として本来その一次情報の総和または平均値として継代が必要なタイミングにおける値が一意に画定しうる。この値を所定の閾値とすればよい。総和および平均値は、細胞の伸展または増殖を直接示す値であるので、理論的に、時間の経過とともに増加する。所定の閾値は、たとえば、培養容器において細胞が伸展または増殖できる方向の実質的な面積、たとえば底面積に、所定の割合を乗じた値として設定できる。所定の割合はたとえば7割から9割程度とすることができる。また、たとえば、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その検定において、細胞の伸展または増殖が現れなくなる統計指標値としての総和また

は平均値を所定の閾値として画定することができる。このとき、複数の検定の培養容器において継代のタイミングに至るものの一次情報の総和または平均値として予め取得することもできる。

[0050] さらに、統計指標値としての分散または偏差は、細胞数を例にとれば、前記のとおり、観測箇所O pにおける細胞の散らばり具合を示し、仮に平均値が同じであっても、培養容器内の培養面にはもはや細胞が伸展または増殖できない箇所が一部に生じていて継代が必要な状況（たとえば図5 B）に至っていることを示す代表値となる。統計指標値としての分散または偏差が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う。観測箇所O pの面積部分として本来その一次情報の分散または偏差として継代が必要なタイミングにおける値が一意に画定しうる。この値を所定の閾値とすればよい。分散または偏差の場合、培養の初期状態では細胞の伸展または増殖はそれぞれの細胞の近傍において起こるので理論的に分散または偏差は一旦減少する。

[0051] そして、通常は、細胞の伸展または増殖の拡大により、時間の経過とともに極小値を取った後に増加に転じる、そして、継代のタイミング以降においては、細胞が伸展または増殖できずに分散または偏差は極大値をとった後に減少に転じる。したがって、所定の閾値は、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その検定において、統計指標値としての分散または偏差が増加から減少に転じる極大値として画定することができる。さらには、特異なケースでは、培養の初期状態で、局所的に急激に細胞が伸展または増殖してしまい、分散または偏差が増加に転じない場合もある。このときは、分散または偏差の時間変化の変曲点が継代のタイミングとなるので、その時間変化の変曲点を所定の閾値とすることができる。このように、継代のタイミングには、極小値、極大値など極値に代表されるように、時間変化において何らかの変曲点が出現する。このような時間変化の変曲点が現れた時点を継代のタイミングに到達した時点として閾値として設定する。特に、分散または偏差が増加に転じない場合は、前記の通り、培

養の初期状態では局所的に急激に細胞が伸展または増殖してしまう場合であるので、極小値にマージン値 α を付加した値を閾値とすることもできる。マージン値 α としては、少なくとも極小値にマージン値 α を付加した値が極大値よりも小さくなるように設定する。さらには、マージン値 α は $|(\text{極大値}) - (\text{極小値})|$ の50%以下であって、この値が0であることが好ましい。この値も、複数の検定用の培養容器において継代のタイミングに至るものの一次情報の分散または偏差として予め取得することもできる。

[0052] 本発明では、細胞が含まれる培地の状態を撮影した画像から細胞に関する1次情報を取得してその統計指標値を計算することにより、細胞の伸展または増殖の進行状態を直接把握することができ、継代のタイミングを適格に把握できる。

[0053] [第2の実施の形態]

続いて、第2の実施の形態の継代のタイミング判定の方法およびそのシステムについて説明する。第2の実施の形態は第1の実施の形態と基本的には同じであるが、一部を変形した態様の実施の形態である。細胞培養システム1と継代タイミング判定ユニット3との構成とは、第1の実施の形態と同じである。以下、第2の実施の形態について、第1の実施の形態と異なる部分について説明し、第1の実施の形態と同じ部分の説明は割愛する。第2の実施の形態の継代の判定プロセスでは、継代判定プロセスが撮像工程(S11)と判定データ作成工程(S12)と判定工程(S13)とからなる点は図2Bに示す第1の実施の形態と同様である。しかし、第2の実施の形態では、判定データ作成工程(S12)において、判定データの作成と、判定工程(S13)における所定の閾値が異なっている。第2の実施の形態では、判定データ作成工程(S12)の判定データの作成において、撮像工程(S11)の複数回の撮影時点から2つの撮影時点を注目撮影時点として選択し、その2つの撮影時点における細胞画像から判定データの作成をおこなって継代タイミングの判定を行う点が第1の実施の形態と異なっている。すなわち、第2の実施の形態では、判定データに経時的要素が加わる。

[0054] (培養面の撮像工程)

第2の実施の形態では、図2Eに示すように、複数の撮影時点で細胞画像の撮影を行う点で第1の実施の形態と同様である。各撮影時点において、定点観測となるように観測箇所Opは同じ箇所を選定する点も、培養が進み、新たな撮影時点が到来したときに、撮像工程を行う点も、同じである。

[0055] (判定データ作成)

図3Aおよび図3Bは、第2の実施の形態の継代の判定プロセスのうち、判定データ作成工程(S12)のフローを示した図である。第2の実施の形態の判定データ作成工程(S12)は、第1の実施の形態に経時的要素を加えるために経時変化指標値の計算を行う。ここで、図3Aは、第2の実施の形態の第1例を示した図である。第1例では、細胞画像から1次情報を取得する1次情報取得工程(S1211)と、1次情報から指標値を計算する統計指標値計算工程(S1212)とを終えた後に、経時変化指標値を計算する経時変化計算工程(S1213)を行う。

[0056] 一方、図3Bは、第2の実施の形態の第2例を示した図である。第2例では、細胞画像から1次情報を取得する1次情報取得工程(S1211)と、1次情報から指標値を計算する統計指標値計算工程(S1212)との間に、経時変化指標値を計算する経時変化計算工程(S1213)を行う。本明細書では、経時変化計算工程(S1213)において、経時変化指標値を計算するために使用される2つの撮影時点を目撃撮影時点とよび、目撃撮影時点のうち時間が前の撮影時点を基準撮影時点と、時間が後の撮影時点の評価撮影時点と、よぶ。経時変化指標値は、目撃撮影時点における1次情報の統計指標値について基準撮影時点における1次情報の統計指標値に対する変化量の値である。

[0057] 第2の実施の形態では、第1例および第2例のいずれでも、継代のタイミングの判定においては複数の撮影時点から選択される2つの目撃撮影時点を使用する。たとえば図2Eの第1撮影時点と第2の撮影時点とで撮影された細胞画像を使用する。第2の実施の形態においての目撃撮影時点は、基準撮

影時点と評価撮影時点とからなる。評価撮影時点は、代表的には、培養が進んで到来した新たな撮影時点である。たとえば、図2Eに示すように、基準撮影時点としての第1撮影時点と評価撮影時点としての第2撮影時点とが選択される。以下、基準撮影時点を実第1撮影時点とし、評価撮影時点を実第2の撮影時点とした注目撮影時点で説明する。2つの注目撮影時点の選択の方法として、第1例および第2例のいずれでも、直近比法と基準比法の2つの選択がある。

[0058] 直近比法では、新たな撮影時点が増えるごとに基準撮影時点と評価撮影時点とのいずれをも最新の注目撮影時点として更新させるものである。すなわち、任意の注目撮影時点（基準撮影時点と評価撮影時点）を使用して直近比法で継代のタイミングの判定を行った場合に、未だ継代に至っていないために、続いて継代のタイミングを行うときには、注目撮影時点（基準撮影時点と評価撮影時点）を更新して継代の判定を行う。これについて、図3Cを参照して、具体的に説明する。図3Cは、撮影時点（ $n-3$ ）から撮影時点（ $n+2$ ）に至るまでの複数の撮影時点（ $n-3$ ）から注目撮影時点（基準撮影時点と評価撮影時点）を選択する直近比法の注目撮影時点の選択の概念を示している。たとえば、撮影時点（ $n-3$ ）を基準撮影時点と、撮影時点（ $n-2$ ）を評価撮影時点とする注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行った後に、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、撮影時点（ $n-2$ ）を基準撮影時点と、撮影時点（ $n-1$ ）を評価撮影時点とする注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。以後、同様に、継代のタイミングの判定に至るまで、基準撮影時点を実撮影時点（ $n-3$ ）から撮影時点（ $n+1$ ）までずらすとともに、評価撮影時点を実撮影時点（ $n-2$ ）から撮影時点（ $n+2$ ）もずらしながら注目撮影時点の更新を繰り返して継代のタイミングの判定を行う。ただし、基準撮影時点と評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。たとえば、基準撮影時点を実1つずらす場合には、評価撮影時点も1つだけずらすように

規則的にずらさなければならない。基準撮影時点を1つしかずらさなかったにもかかわらず、評価撮影時点を2つずらすような変則的なずらし方はできない。

[0059] 基準比法では、基準撮影時点と評価撮影時点とからなる注目撮影時点は以下のように選択される。図3Eは、撮影時点($n-3$)から撮影時点($n+2$)にいたるまでの複数の撮影時点($n-3$)から注目撮影時点(基準撮影時点と評価撮影時点)を選択する基準比法の注目撮影時点の選択の概念を示している。基準比法では、複数の撮影時点から初期の任意の撮影時点を基準撮影時点として決定し、基準撮影時点以降の任意の撮影時点を評価撮影時点として選択する。たとえば、撮影時点($n-3$)を基準撮影時点として固定し、まず撮影時点($n-2$)を評価撮影時点とする注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。この判定の後に、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、撮影時点($n-2$)を基準撮影時点はそのまま変更せずに、撮影時点($n-1$)を評価撮影時点とするように注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。以後、同様に、継代のタイミングの判定に至るまで、基準評価撮影時点を撮影時点($n-3$)のままとして、評価撮影時点のみを撮影時点($n-2$)から撮影時点($n+2$)まで、ずらしながら注目撮影時点の更新を繰り返して継代の判定を行う。すなわち、基準比法の場合には、基準撮影時点は継代のタイミングの判定ごとに固定して使用し、新たな撮影時点を評価撮影時点として変更するように、評価撮影時点であるのみを最新の撮影時点に更新するように選択し、継代のタイミングの度にこれを繰り返すものである。この場合も、基準撮影時点と評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。

[0060] 直近比法では基準撮影時点と評価撮影時点が共に移動するので、基準撮影時点と評価撮影時点とのそれぞれの撮影時点における1次情報の相対的な比較を行うこととなる。一方、基準比は基準撮影時点である第1撮影時点が固定されるので基準撮影時点の第1撮影時点(固定)と評価撮影時点の第2撮

影時点（移動）とにおける１次情報の絶対的な比較となる。また、各撮影時点の間の時間間隔は任意に設定できるが、特に直近比法である連続する２つの撮影時点を選択する方法では各撮影時点の間の時間間隔は一定となるように設定することが好ましい。

[0061] 直近比法では、代表的には、図３Ｃに示すように、基準撮影時点と評価撮影時点との間に撮影時点が無いように選択されるが、図３Ｄに示すように、基準撮影時点と評価撮影時点との間に評価に使用しない任意の数の撮影時点を設定するように選択してもよい。図３Ｄは基準撮影時点と評価撮影時点との間に、評価に使用しない一つの撮影時点がある例を示している。その後、基準撮影時点と評価撮影時点との間が一定の間隔となるように、かつ基準撮影時点と評価撮影時点との選択が順番に選択される限り、継代のタイミングの判定に使用することが可能となる。また、基準比法では基準撮影時点は固定であり、評価撮影時点は更新されるので、基準撮影時点と評価撮影時点との間との間に撮影時点が存在する。

[0062] 以下、第１例と第２例とのそれぞれについて、直近比法を例として、ある注目撮影時点について、基準撮影時点と評価撮影時点とが連続する例で説明する。以下、ここでは、注目撮影時点につき、第１撮影時点を基準撮影時点と、第２撮影時点の評価撮影時点として説明する。基準撮影時点と評価撮影時点とが連続しない直近比法および基準比法の場合でも、注目撮影時点以外の撮影時点におけるデータは、継代のタイミングの判定のためのデータの作成には使用しないだけであるので、継代の判定プロセスについては、以下の例と同じである。

[0063] （１次情報取得）

第１例と第２例では、一次情報取得工程は同じである。１次情報取得工程（Ｓ１２１１）では、処理装置３３は、各撮影時点で取得された画像から、各撮影時点において１次情報を取得する。１次情報取得工程は第１の実施の形態と同じであって、たとえば細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間距離等である。ここでの説明は割愛する。以下、第１例を

説明し、その後に第2例について説明する。

[0064] <第1例>

(統計指標値取得)

第1例では、前記の通り、図3Aに示すように、1次情報取得工程(S1211)で各撮影時点の1次情報を取得した後に、統計指標値取得工程(S1212)で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算する。統計指標値は、第1の実施の形態と同様に、1次情報を代表的に表す代表値として画定される指標値であって、たとえば総和、平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。総和は、複数の観測箇所の細胞数の総和、細胞の専有面積の総和、細胞の単体面積の総和、細胞間距離の総和である。平均値は、複数の観測箇所の細胞数の平均値、細胞密度の平均値、細胞数の専有面積の平均値、細胞の単体面積の平均値、細胞間距離の平均値である。分散と偏差は、複数の観測箇所の細胞数の分散と偏差、細胞密度の分散と偏差、細胞の専有面積の分散と偏差、細胞の単体面積の分散と偏差、細胞間距離の分散と偏差である。ここで、統計指標値としての分散または偏差が培養容器内の細胞の均一性の指標であるので、統計指標値として総和または平均値を選択するよりも好適に継代のタイミングの判定を行うことができる点は第1の実施の形態と同様である。

[0065] (経時変化計算工程(経時変化指標値の取得))

続いて、経時変化計算工程(S1213)において、各撮影時点で計算された各1次情報の統計指標値から、経時変化指標値を計算する。経時変化指標値は2つの撮影時点の1次情報の値について1つ作成される。本実施の形態では、注目撮影時点は判定に使用する撮影時点の個数と同じである。注目撮影時点のそれぞれに対して1次情報が取得されるので注目撮影時点の数と1次情報の数は同じになる。したがって、経時変化指標値の数は注目撮影時点の数より1つ少ない数となる。また、経時変化指標値は、観測箇所Opの数だけ、または複数の観測箇所Opをそれより少ない個数に代表値化した場合にはその数だけ、経時変化指標値を計算する。

[0066] 経時変化計算工程（S 1 2 1 3）では、第 1 の実施の形態の統計指標値を計算する統計指標値取得工程（S 1 2 1 2）の後に経時変化指標値を計算する工程を付加した工程である。これについて、図 3 F を参照して説明する。図 3 F は第 1 例と第 2 例の場合について、時間（横軸）に対する値（縦軸）の変化の概念を示した図である。第 1 例の場合の縦軸は統計指標値であり、後述する第 2 例の場合の縦軸は一次情報の値である。図 3 F は、注目撮影時点である連続する 2 つの撮影時点の直近比法の例として示しているが、第 1 撮影時点と第 2 撮影時点を連続する撮影時点として選択しない前述の基準比法の場合では、図 3 F について、第 1 撮影時点と第 2 撮影時点との間に示されていない撮影時点があるものとして読み替えればよい。

[0067] 2 つの撮影時点につき第 1 撮影時点を基準撮影時点として固定し評価撮影時点である第 2 撮影時点を更新するように選択する基準比法では、常に第 1 撮影時点が固定される。そして、この固定された 1 次情報の値に対して更新される第 2 撮影時点における 1 次情報の値として画定されるので、細胞の伸展または増殖とともに 1 次情報は増加する。経時変化指標値はその増加割合の増減であるから、1 次情報の増加傾向に合わせて統計指標値の経時変化指標値は増加または減少の傾向を示す。一方、1 次情報が細胞間の相対距離の場合には細胞の伸展または増殖とともに 1 次情報は減少する。この場合も、経時変化指標値はその減少割合の増減であるから、1 次情報の減少傾向に合わせて統計指標値の経時変化指標値は減少または増加の傾向を示す。そして、継代のタイミングが近くなるにしたがって、その増加または減少の変化の度合いが鈍り、所定の値に向かって増加または減少の変化率が飽和するような変化傾向を示す。一方、2 つの撮影時点につき第 1 撮影時点と第 2 撮影時点とを連続する撮影時点として選択する直近比法では、第 1 撮影時点および第 2 撮影時点が常に更新され、第 1 撮影時点および第 2 撮影時点の相対比較となるため、細胞の伸展または増殖の初期の段階では、1 次情報が単純増加または単純減少（1 次情報が細胞間の相対距離の場合に単純減少）して統計指標値の経時変化指標値も増加または減少するものの、細胞の伸展または増

殖が進むにしたがって、第1撮影時点における1次情報の増加の度合いと第2撮影時点における1次情報の増加または減少の度合いが変化するため、継代のタイミングが近くなるにしたがって、経時変化指標値の増加または減少の度合いが鈍る傾向を示す。そして、継代のタイミングに至ると増加傾向にあった経時変化指標値は所定の値を極値として逆に減少し、減少傾向にあった経時変化指標値は逆に増加する。以下、ここでは細胞の伸展または増殖とともに1次情報が増加の変化傾向を示す例で説明するが、細胞の伸展または増殖とともに減少の変化傾向を示す1次情報の場合には、増加と減少を逆に読むことで細胞の伸展または増殖とともに1次情報が増加の変化傾向を示す例を適用することができる。

[0068] 経時変化指標値の計算では、複数の撮影時点から2つの撮影時点（第1撮影時点と第2撮影時点）が選択される。図3Fでは、最新の連続する2つの撮影時点（第1撮影時点（ t_1 ）と第2撮影時点（ t_2 ））として選択される例を示している。また、図3Fでは、第1撮影時点（ t_1 ）における統計指標値（ a_1 ）が第2撮影時点（ t_2 ）において統計指標値（ a_2 ）に増加している旨を示している。その撮影時点で継代のタイミングに至っているかを判定し、継代のタイミングに至っていなければ、再度新たな撮影時点を含めた最新の連続する2つの撮影時点が選択され、判定データを作成する。

[0069] 経時変化指標値は、注目撮影時点（第1撮影時点と第2撮影時点）の時間間隔について、第1撮影時点（基準撮影時点）と第2撮影時点（評価撮影時点）との間における1次情報の統計指標値の差分値の値である差分変化量とすることができる。この差分変化量の経時指標値では、第1撮影時点における1次情報の統計指標値に対する第2撮影時点の1次情報の統計指標値の差分値である差分変化量（ $a_2 - a_1$ ）となる。差分変化量はいわば増分量である。1次情報を細胞数とした例では、これは第1撮影時点と第2撮影時点との時点における細胞数の総和の増分差の値となる。

[0070] また、経時変化指標値は、第1撮影時点（基準撮影時点）における1次情報の統計指標値に対する第2撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の

統計指標値の割合変化量とすることもできる。この割合変化量の経時指標値では、第1撮影時点における1次情報の統計指標値に対する第2撮影時点の1次情報の統計指標値の割合変化量である(a_2/a_1)となる。また、経時変化指標値は、第1撮影時点(基準撮影時点)における1次情報の統計指標値に対する第1撮影時点(基準撮影時点)と第2撮影時点(評価撮影時点)との間における1次情報の統計指標値の差分量の割合である差分割合変化量とすることもできる。この差分割合変化量では、第1撮影時点(基準撮影時点)の1次情報の統計指標値と第2撮影時点(評価撮影時点)の1次情報の統計指標値との間の増分量の第1撮影時点における1次情報の統計指標値に対する差分増分量の割合である差分割合変化量($(a_2 - a_1)/a_1$)とすることができる。たとえば、1次情報を細胞数とした例では、前者の割合変化量は第2撮影時点での細胞数の総和の第1撮影時点での細胞数の総和に対する割合の値であり、後者の差分割合変化量は第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの細胞数の総和の増分の第1撮影時点での細胞数の総和に対する割合の値である。

[0071] また、経時変化指標値は、2つの撮影時点(第1撮影時点と第2撮影時点)の時間間隔に対する、第1撮影時点における1次情報の統計指標値と第2撮影時点における1次情報の統計指標値とについての前記の差分変化量、割合変化量および差分割合変化量とすることもできる。つまり、前記の差分変化量($a_2 - a_1$)と、前記の割合変化量(a_2/a_1)および差分割合変化量($(a_2 - a_1)/a_1$)であって、これらをそれぞれ第1撮影時点と第2撮影時点との時間差($t_2 - t_1$)で除して、単位時間当たりの変化率である経時変化指標値とすることができる。すなわち、連続する2つの撮影時点における1次情報の統計指標値について、差分変化量の単位時間変化率($(a_2 - a_1)/(t_2 - t_1)$)、割合変化量の単位時間変化率($a_2/[a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$)、差分割合変化量の単位時間変化率($(a_2 - a_1)/[a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$)とすることができる。これらの経時変化指標値は、いずれも注目撮影時点における1次情報の統計指標値の単位時間当たりの増加率を意味し、同時に増加

速度でもある。1次情報を細胞数とした例では、細胞数の単位時間当たりの増加率、すなわち増加速度（増殖速度）である。ここでいう、増加速度（増殖速度）は2つの撮影時点における統計指標値を線形近似して得られる差分値として近似された速度（以下、単純速度）である。

[0072] 増加速度（増殖速度）は、前記の例に加え、1次情報の統計指標値の経時変化を現すことができる限り、時間経過に対する増加率として広くさまざまな定義に基づいて画定することができる。細胞の増殖においては、増加の原因が細胞分裂であるため、増加速度（増殖速度）は一定ではなく、条件がそろえば、理論上は、2倍、4倍、8倍・・・と、特に、倍数が2倍基準で増加する特徴をもつ。一般に、増加速度（増殖速度）を定量的に表す場合には比増殖速度が使用される。本願発明でも、1次情報が細胞数である場合にはもとより、1次情報が細胞数以外の場合（前述の細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間の相対距離等）であっても、増加の原因は細胞分裂であることにはかわりはなく、ほぼ2倍で増加する。実際には、1次情報が細胞数の場合であっても、一つ一つの細胞の分裂タイミングが異なるので、単位時間当たりちょうど2倍で増加することは稀であるので、1次情報が細胞数であるか否かにかかわらず、単位時間当たりの増加倍率は e^{μ} 倍に近似した倍率である。この時の μ を比増殖速度と呼ぶ。したがって、増加速度（増殖速度）として、基準時点と評価時点の二つの撮影時点における統計指標値を指数近似（ $e^{\mu t}$ ）して得られる比増殖速度 μ を採用することができる。

[0073] 図3Gを参照して、経時変化指標値として、比増殖速度および倍加時間 t_d を適用する例について説明する。すなわち、基準時点を基準撮影時点として第1撮影時点 t_1 と設定し、そのときの1次情報の統計指標値が a_1 であるとする。そして、任意の撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]のそれぞれの時点において、評価撮影時点として、1次情報の統計指標値 a_i [$i = 2 \sim n$]を測定する。各評価撮影時点における1次情報の統計指標値 a_i [$i = 2 \sim n$]は、第1撮影時点 t_1 の1次情報の統計指標値が a_1 との間に、一般化された関係として $a_i/a_1 = e^{[(\mu i) \cdot (t_i - t_1)]}$ の関係が成立するように変化するものとして近似できる。

ここで、 μ_i は撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]における比増殖速度であり、 $\mu_i = [\ln(a_i/a_1)] / (t_i - t_1)$ となる。

[0074] また、増加速度（増殖速度）として、倍加時間（ t_{ad} ）を採用することができる。倍加時間は、評価時点の量が基準時点の量の2倍になるまでに必要な時間であり、撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]のうち $i = k$ において2倍になると仮定すると、倍加時間 $t_{ad} = t_k - t_1$ となる。この時間は、比増殖速度との関係では、単位時間当たりの増加倍率が e^μ であるならば、 $e^{\mu \cdot t_{ad}} = 2$ となる時間である。すなわち、前述の説明から、任意の撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]のそれぞれの時点において、1次情報の経時変化指標値として μ_i が得られたならば、各評価撮影時点における1次情報の経時変化指標値 μ_i [$i = 2 \sim n$]は、各評価撮影時点 t_i の1次情報の経時変化指標値が t_{di} との間に、一般化された関係として $e^{(\mu_i) \cdot (t_{di})} = 2$ の関係が成立する。つまり倍加時間 $t_{di} = \ln 2 / \mu_i = (\ln 2) \cdot (t_i - t_1) / \ln(a_i/a_1)$ となる。ここで、わかりやすい例として、撮影時点 t_i [$2 < i < n$]のうち、 $i = k$ [$2 < k < n$]における1次情報の統計指標値 a_k が基準撮影時点である第1撮影時点 t_1 の統計指標値 a_1 の2倍になったと仮定する（ $a_k = 2a_1$ ）。このとき、基準撮影時点である第1撮影時点 t_1 から評価撮影時点である撮影時点 t_k [$2 < k < n$]までの時間が、いわゆる倍加時間 t_{ad} であって、 $a_k/a_1 = e^{(\mu_k \cdot t_{ad})} = 2$ の関係が成立する。ここから、 t_k において、比増殖速度 $\mu_k = (\ln 2) / (t_k - t_1)$ となる。

[0075] また、倍加時間に加えて、増加速度（増殖速度）として、評価時点の量が基準時点の量の所定の倍数になるまでに必要な時間を採用することができる。本願では、これを所定倍加時間（ t_x ）と定義する。所定倍加時間は所定の倍数 X 倍になるのに必要な時間であり、単位時間当たりの増加倍率が e^μ であるならば、 $e^{\mu \cdot t_x} = X$ として定義される。すなわち、前述の説明から、任意の撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]のそれぞれの時点において、1次情報の経時変化指標値として μ_i が得られたならば、各評価撮影時点における1次情報の経時変化指標値 μ_i [$i = 2 \sim n$]は、各評価撮影時点 t_i の1次情報の経時変化指標

値が t_{xi} との間に、一般化された関係として $e^{[(\mu_i) \cdot (t_{xi})]} = X$ の関係が成立する。つまり所定倍加時間 $t_{xi} = \ln X / \mu_i = (\ln X) \cdot (t_i - t_1) / \ln(a_i / a_1)$ となる。前述の撮影時点 t_k における所定倍加時間は $t_x = (\ln X) \cdot (t_k - t_1) / \ln 2$ であり、先述の倍加時間は、 $X = 2$ のときの所定倍加時間ということになる。

[0076] 判定データ作成工程 (S 1 2) では、上記で得られた経時変化指標値を判定データとすることができる。これらは、同様に、1 次情報である細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間距離等のそれぞれの選択と、統計指標値である総和、平均値、分散、偏差のそれぞれの選択とに応じて、経時変化指標値を計算すればよい。第 1 例の経時変化指標値は、1 次情報の統計指標値の経時変化を示す代表値であるといえる。複数の経時変化指標値をそのままの数の複数の判定データとしてもよいし、平均値、最大値、最小値などにより複数の経時変化指標値を一の経時変化指標値として、それを一の判定データとしてもよい。

[0077] (継代判定)

判定データ作成工程 (S 1 2) で判定データの作成が完了した後は、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程 (S 1 3) を実行する。判定工程 (S 1 3) では、判定データ作成工程 (S 1 2) で作成した判定データに基づいて、継代のタイミングの判定を行う。第 1 例では判定データは統計指標値の経時変化指標値である。統計指標値は、培養容器内から選択される所定の複数の地点における所定の観測箇所 O_p の培養面の細胞の状態を定量的に示す。したがって、第 1 例では、所定の観測箇所 O_p の箇所における統計指標値としての総和の経時変化指標値となり、第 1 の実施の形態よりも、培養容器内で細胞が伸展または増殖できる余地を正確に表しうる代表値となる。

[0078] 判定工程 (S 1 3) では、経時変化計算工程 (S 1 2 1 3) で計算された経時変化指標値たる判定データと所定の閾値とを比較する。ここで、判定データが所定の閾値に至ったときを継代のタイミングに至ったものと判定する

。所定の閾値は、2つの撮影時点について、第1撮影時点を基準撮影時点として固定して第2撮影時点を逐次更新するように選択する場合では、第1の実施の形態と同様である。第1の実施の形態と同様に、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、継代のタイミングとなる時点における統計指標値を取得して、経時変化指標値を求めて、これを所定の閾値として画定する。経時変化の要素を加えたとしても、継代のタイミングの判定における統計指標値がもつ特徴は失われず、第1の実施の形態で説明したとおりである。すなわち、継代のタイミングには、経時変化指標値の時間変化において、極小値、極大値など極値に代表されるような何らかの変曲点が出現する。このような時間変化の変曲点が現れた時点を経代のタイミングに到達した時点と判断するための閾値として設定する。

[0079] 一方、2つの撮影時点について、第1撮影時点と第2撮影時点とを連続する撮影時点として選択する場合では、所定の閾値は以下の通りとなる。

第2撮影時点の1次情報が増加して統計指標値も増加する際には、第1撮影時点の1次情報も増加して統計指標値も増加する。細胞の伸展または増殖の初期の段階では、第2撮影時点の統計指標値の増加量が第1撮影時点の統計指標値の増加量よりも大きくなるが、細胞の伸展または増殖に伴って、それぞれの徐々に増加量は減り、細胞の継代のタイミングに至った段階では、第2撮影時点の統計指標値の増加量は第1撮影時点の統計指標値の増加量よりも小さくなる。そのため、細胞の継代のタイミングに至った段階で、統計指標値は任意の閾値において極値を取って減少する。この極値を所定の閾値として設定する。極値は、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め実施する検定としての試験で画定する。その試験において、継代のタイミングとなる時点における統計指標値から経時変化指標値を求めて、経時変化指標値が極値をとるときに、その極値を所定の閾値と設定する。さらには、経時変化指標値が所定の閾値に至ったときには継代のタイミングに到達してしまっているので、それよりも少し前の時点が継代に最も適したタイミングと

いえる。したがって、所定の閾値を「経時変化指標値の極値からマージン値 α を減じた値（「経時変化指標値の極値」－「マージン値 α 」）として設定することができる。これにより、継代のタイミングにきわめて近い時点でまだ細胞の伸展または増殖に鈍化がみられない細胞が良好な状態で継代のタイミングに至っているか否かを判定することができる。「マージン値 α 」も予め実施する検定としての試験で設定する。

[0080] 判定データの数をもととした場合には、その1つの判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定する。判定データの数をもととした場合には、その複数の判定データのうちの所定の数の判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定することができる。

さらには、その複数の判定データのうちのすべての判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、すべての判定データが所定の閾値に至るまでの時間を要することになるので、継代のタイミングに至っているかを比較的遅めに判断することとなる。

逆に、その複数の判定データのうちの少なくとも1つの判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、一の判定データが所定の閾値に至れば判定できるので、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。

[0081] <第2例>

続いて、第2例について説明する。第1例では1次情報取得工程（S1211）の各撮影時点で1次情報を取得した後に、統計指標値取得工程（S1212）で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算し、その後、経時変化計算工程（S1213）において経時変化指標値を計算して判定データとした。しかし、第2例では、図3Bに示すように、1次情報取得工程（S1211）で各撮影時点の1次情報を取得した後に、経時変化

計算工程（S 1 2 1 3）を実行して1次情報の経時変化指標値を計算し、その後統計指標値取得工程（S 1 2 1 2）で経時変化指標値の統計指標値を計算して判定データとする点で異なる。1次情報および1次情報取得工程（S 1 2 1 1）は第1の実施の形態および第1例と同様であるので割愛する。

[0082] （経時経時変化計算工程（経時変化指標値の取得））

続いて、経時変化計算工程（S 1 2 1 3）において、各撮影時点で計算される各1次情報の経時変化指標値を計算する。経時変化指標値は、各撮影時点間の1次情報の変化量である。第2例における経時変化指標値は、第1例と同様に差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間である。第1例では1次情報の統計指標値の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間であるのに対し、第2例では1次情報の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間である点が異なるのみである。したがって、前述の第1例での経時変化指標値の算出において、1次情報の統計指標値から経時変化指標値を算出するところ、「1次情報の統計指標値」を単に「1次情報」と読み替えて、第1例を第2例に適用すれば良い。したがって、第2例では1次情報の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間の算出についての詳細な説明は割愛する。また、第2例でも、第1例と同様に、変化速度は比増殖速度として適用することが可能であって、変化時間は倍加時間として適用することが可能である。

[0083] 第2例の経時変化指標値について、図3Fを参照して説明する。図3Fは第1例と第2例の場合について、時間（横軸）に対する一次情報（縦軸）の変化の概念を示した図である。第2例では、第1例の経時変化計算工程（S 1 2 1 3）の説明における統計指標値、すなわち経時変化指標値としての a_1 、 a_2 を、第2例の1次情報取得工程（S 1 2 1 1）で取得された1次情報の値と読み替えればよい。ここでは、経時変化指標値は、1次情報の個数に対応した個数の経時変化指標値が得られる。第2例の経時変化指標値は、1次情報の経時変化傾向を直接的な示す値であるといえる。

[0084] (統計指標値取得)

では、図3Bに示すように、経時変化計算工程(S1213)で第1撮影時点と第2撮影時点との1次情報の経時変化指標値を取得した後に統計指標値取得工程(S1212)で経時変化指標値の統計指標値を計算する。第2例における統計指標値は、1次情報の経時変化指標値を代表的に表す代表値として画定される指標値であって、たとえば平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。第2例では、経時変化指標値の統計指標値を算出するものであるので、複数の観測箇所Opのそれぞれにおける1次情報の経時変化指標値の平均値、分散、偏差などである。ここで求めた統計指標値を判定データとして、継代のタイミングの判定を行う。複数の統計指標値をそのままの数の複数の判定データとしてもよいし、平均値、最大値、最小値などにより複数の統計指標値を一の統計指標値として、それを一の判定データとしてもよい。

[0085] (継代判定)

判定データ作成工程(S12)において、判定データの作成が完了した後には、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程(S13)を実行する。判定工程(S13)では、判定データ作成工程(S12)で作成した統計指標値に基づいて、継代のタイミングの判定を行う。第2例の判定データは、経時変化指標値の統計指標値であるため、第1例の統計指標値の経時変化指標値たる判定データと同様に、1次情報と、経時変化と、統計指標値の要素が含まれているので、継代のタイミングの判定を行う判定データとしては第1例と変わらず、継代のタイミングの判定を行う上では有効である。

[0086] 判定工程(S13)では、統計指標値取得工程(S1202)で計算された統計指標値と所定の閾値とを比較する。所定の閾値は第1の実施の形態と同様である。第1の実施の形態と同様に、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、継代のタイミングとなる時点における統計指標値を取得して、経時変化指標値を求めて

、これを所定の閾値として画定する。経時変化の要素を加えたとしても、継代のタイミングの判定における統計指標値がもつ特徴は失われず、第1の実施の形態で説明したとおりである。

第1例の場合と同様に、判定データの数について、1の代表値として作成した場合には、判定データの数をもつとした場合には、その1つの判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定する。判定データの数をもつとした場合には、その複数の判定データのうちの所定の数の判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定することができる。

さらには、その複数の判定データのうちのすべての判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、すべての判定データが所定の閾値に至るまでの時間を要することになるので、継代のタイミングに至っているかを比較的遅めに判断することとなる。

逆に、その複数の判定データのうちの少なくとも1つの判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、一の判定データが所定の閾値に至れば判定できるので、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。

[0087] [第3の実施の形態]

続いて、第3の実施の形態の継代のタイミング判定の方法およびそのシステムについて説明する。第3の実施の形態は、第1の実施の形態および第2の実施の形態に対して、一部を変形した態様の実施の形態である。第3の実施の形態では、判定データ作成工程（S12）における判定データの作成において、撮像工程（S11）で撮影した複数回の撮影時点から少なくとも3つの撮影時点を注目撮影時点として選択し、その注目撮影時点における細胞画像から判定データの作成をおこなって継代タイミングの判定を行う点が第1の実施の形態および第2の実施の形態と異なっている。第3の実施の形態

でも、判定データに経時的要素が加わる。細胞培養システム 1 と継代タイミング判定ユニット 3 との構成とは、第 1 の実施の形態と同じである。以下、第 3 の実施の形態について、第 1 の実施の形態および第 2 の実施の形態と異なる部分について説明し、第 1 の実施の形態および第 2 の実施の形態と同じ部分の説明は割愛する。第 3 の実施の形態の継代の判定プロセスも、図 2 B に示す第 1 の実施の形態の継代判定プロセスと同様に、撮像工程（S 1 1）と判定データ作成工程（S 1 2）と判定工程（S 1 3）とからなる。

[0088]（培養面の撮像工程）

第 3 の実施の形態では、図 2 E に示すように、第 1 の実施の形態と第 2 の実施の形態と同様に、撮像工程（S 1 1）において、複数の撮影時点で細胞画像の撮影を行う。各撮影時点において、定点観測となるように観測箇所 Op は同じ箇所を選定する点も同じである。

[0089]（判定データ作成）

判定データ作成工程（S 1 2）は図 3 A と図 3 B に示す第 2 の実施の形態の継代の判定プロセスと同様である。第 3 の実施の形態では、判定データ作成工程（S 1 2）における判定データの作成は、第 1 例（図 4 A）と第 2 例（図 4 B）、第 3 例（図 4 C）とがある。第 3 の実施の形態では、第 2 の実施の形態と異なり、経時変化指標値の計算の工程につき、1 次経時変化工程（S 1 2 2 2）と、2 次経時変化工程（S 1 2 2 2）と、の 2 段階で実行する。本実施の形態の第 1 例（図 4 A）では、細胞画像から 1 次情報を取得する 1 次情報取得工程（S 1 2 2 1）と、その後に 1 次情報から統計指標値を計算する統計指標値計算工程（S 1 2 2 2）と、1 次情報の 1 次経時変化指標値を計算する 1 次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）と、1 次経時変化指標値から 2 次経時変化指標値を計算する 2 次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）とを備える。本実施の形態の第 2 例（図 4 B）でも、細胞画像から 1 次情報を取得する 1 次情報取得工程（S 1 2 2 1）と、1 次情報の 1 次経時情報変化量を計算する 1 次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）と、1 次経時変化指標値から 2 次経時変化指標値を計算する 2 次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）

とを行い、その後に2次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値計算工程(S 1 2 2 2)と、を備える。さらに、本実施の形態の第3例(図4 C)では、細胞画像から1次情報を取得する1次情報取得工程(S 1 2 2 1)と、1次情報の1次経時情報変化量を計算する1次経時変化計算工程(S 1 2 2 3)と、1次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値計算工程(S 1 2 2 2)と、1次経時変化指標値の統計指標値から2次経時変化指標値を計算する2次経時変化計算工程(S 1 2 2 4)と、を備える。

[0090] 第3の実施の形態では、第1例から第3例のいずれにおいても、継代のタイミングの判定においては3つ以上の撮影時点を注目撮影時点として、撮影された細胞画像を使用する。注目撮影時点は、第2の実施の形態と同様に、評価撮影時点と基準撮影時点とからなる。注目撮影時点を3つの撮影時点とする場合は、たとえば図2 Eの第1撮影時点と第2の撮影時点と第3の撮影時点とで撮影された細胞画像を使用する。以下、代表例として、3つの撮影時点で撮影された細胞画像を使用する例で説明する。4つ以上の撮影時点を注目撮影時点とする場合も本実施の形態と同様であるが、これについては具体的に第4の実施の形態として後述する。

[0091] 第3の実施の形態においても、注目撮影時点の選択は、第2の実施の形態と同様に、第1例および第2例のいずれでも、直近比法と基準比法との2つの選択の方法がある。第3の実施の形態の直近比法および基準比法では、注目撮影時点において評価撮影時点と基準撮影時点との少なくとも一方を複数にする形態である。まず、以下、基準撮影時点を1点とし、評価撮影時点を2点とし形態で説明する。この場合、直近比法は、代表例では、複数の撮影時点から連続する3つの撮影時点(第1撮影時点と第2の撮影時点と第3の撮影時点)を注目撮影時点として選択する。第2の実施の形態と同様に、直近比法では新たな撮影時点が増えとともに第1撮影時点と第2撮影時点と第3撮影時点が最新の撮影時点として更新される。

[0092] まず第3の実施の形態の直近比法について、図4 Dを参照して、具体的に説明する。図4 Dは、任意の撮影時点、たとえば撮影時点($n-3$)から撮

影時点 ($n + 2$) に至るまでの撮影時点から直近比法の注目撮影時点 (基準撮影時点と評価撮影時点) を選択する概念を示している。たとえば、撮影時点 ($n - 3$) を基準撮影時点と、撮影時点 ($n - 2$) を第 1 評価撮影時点と、撮影時点 ($n - 1$) を第 2 評価撮影時点とするように、1 つの基準撮影時点と 2 つの評価撮影時点とを注目撮影時点として選択して、継代のタイミングの判定を行う。その後、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、続いて撮影時点 ($n - 2$) を基準撮影時点と、撮影時点 ($n - 1$) を第 1 評価撮影時点と、撮影時点 n を第 2 評価撮影時点と、する注目撮影時点を選択して、継代のタイミングの判定を行う。以後、同様に、撮影時点 ($n - 1$) を基準撮影時点とすれば、撮影時点 n を第 1 評価撮影時点と、撮影時点 $n + 1$ を第 2 評価撮影時点と、するように新たな撮影時点の到来とともに注目撮影時点をずらしながら更新するように繰り返して継代のタイミングの判定を行う。この場合も、第 2 の実施の形態と同様に、基準撮影時点と評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。

[0093] 直近比法では、代表的には、図 4 D に示すように、基準撮影時点と第 1 評価撮影時点との間に撮影時点が無いように選択するが、第 2 の実施の形態と同様に、図 4 E に示すように、基準撮影時点と第 1 評価撮影時点との間に継代のタイミングの判定に使用しない任意の数の撮影時点を設定するように注目撮影時点を選択してもよい。図 4 E はこの例を示している。また、直近比法では、基準撮影時点と第 1 評価撮影時点との間に評価に使用しない複数の撮影時点があるように注目撮影時点を設定してもよいし、基準撮影時点と第 1 評価撮影時点との間に評価に使用しない撮影時点の有無にかかわらず、第 1 評価撮影時点と第 2 評価撮影時点との間に評価に使用しない複数の撮影時点があるように注目撮影時点を設定してもよい。基準撮影時点と第 1 評価撮影時点と第 2 評価撮影時点とのそれぞれの間が一定の間隔となるように、かつ基準撮影時点と第 1 評価撮影時点と第 2 評価撮影時点との選択が同じパターンで順番に選択される限り、注目撮影時点として継代のタイミングの判定

に使用することが可能となる。また、基準比法では基準撮影時点は固定であり、評価撮影時点は更新されるので、基準撮影時点と評価撮影時点との間と間に撮影時点が存在する。この場合も、基準撮影時点と第1評価撮影時点と第2評価撮影時点とのそれぞれの間に評価に使用しない撮影時点の有無にかかわらず、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。

[0094] 続いて、第3の実施の形態の基準比法について、図4Fを参照して、具体的に説明する。基準比法では、基準撮影時点と第1評価撮影時点と第2評価撮影時点とからなる注目撮影時点は以下のように選択される。図4Fは、撮影時点 $(n-3)$ から撮影時点 $(n+2)$ に至るまでの複数の撮影時点から注目撮影時点（基準撮影時点と評価撮影時点）を選択する基準比法の注目撮影時点の選択の概念を示している。基準比法では、複数の撮影時点から初期の任意の撮影時点を基準撮影時点として決定して固定し、基準撮影時点以降の任意の撮影時点を第1評価撮影時点および第2評価撮影時点として選択する。そして、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、基準撮影時点を移動させることなく第1評価撮影時点および第2評価撮影時点のみをずらすように注目撮影時点（基準撮影時点と評価撮影時点）を決定する。たとえば、撮影時点 $(n-3)$ を基準撮影時点とした場合には、撮影時点 $(n-3)$ を基準撮影時点として固定し、撮影時点 $(n-2)$ を第1評価撮影時点と、撮影時点 $(n-2)$ を第2評価撮影時点とする注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。さらに、この判定の後に、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、撮影時点 $(n-2)$ を基準撮影時点はそのまま変更せずに、撮影時点 $(n-1)$ を第1評価撮影時点と、撮影時点 $(n-1)$ を第2評価撮影時点と、するように注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。以後、同様に、継代のタイミングの判定に至るまで、基準評価撮影時点を撮影時点 $(n-3)$ のままとして

、新たな撮影時点のタイミングが到来し撮影時点が追加されるとともに第1評価撮影時点および第2評価撮影時点をずらしながら注目撮影時点の更新を繰り返して継代の判定を行う。すなわち、基準比法の場合には、基準撮影時点は継代のタイミングの判定ごとに固定して使用し、新たな撮影時点が加わるたびに第1評価撮影時点および第2評価撮影時点を変更するように更新して選択し、継代のタイミングの度にこれを繰り返すものである。基準比法の場合も、直近比法の場合と同様に、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。

[0095] 基準比法の場合には、基準撮影時点は固定となるので、新たな撮影時点のタイミングが到来し撮影時点が追加されるときに第1評価撮影時点をずらすことにより、基準撮影時点と第1評価撮影時点との間には、必ず継代のタイミングの判定に使用しない任意の数の撮影時点が存在する。このとき、第1評価撮影時点と第2評価撮影時点との間にも継代のタイミングの判定に使用しない任意の数の撮影時点が存在するように設定することもできる。たとえば、図4 Gに、撮影時点($n-3$)を基準撮影時点として固定し、撮影時点($n-2$)を第1評価撮影時点と、撮影時点(n)を第2評価撮影時点とする注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う例を示している。この時、撮影時点($n-1$)は評価撮影時点としては選択しておらず、継代のタイミング判定には使用しない。この判定の後に、未だ継代のタイミングに至っていないと判定した場合には、撮影時点($n-3$)は基準撮影時点としてそのまま、撮影時点($n-1$)を第1評価撮影時点と、撮影時点($n+1$)を第2評価撮影時点と、するように注目撮影時点を選択して継代のタイミングの判定を行う。以後、同様に、継代のタイミングの判定に至るまで、基準評価撮影時点を撮影時点($n-3$)のままとし、新たな撮影時点のタイミングが到来し撮影時点が追加されるとともに第1評価撮影時点および第2評価撮影時点をずらしながら注目撮影時点の更新を繰り返して継代の判

定を行う。この場合も、前記のとおり、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをずらしながら更新するときには、基準撮影時点と第1評価撮影時点および第2評価撮影時点とをそれぞれ順序にしたがって規則的にずらさなければならない。

[0096] 直近比法では基準撮影時点と評価撮影時点（第1評価撮影時点および第2評価撮影時点）が共に移動するので、基準撮影時点と評価撮影時点とのそれぞれの撮影時点における1次情報の相対的な比較を行うこととなる。一方、基準比は基準撮影時点が固定されるので、基準撮影時点（時間経過によらずに固定）に対する評価撮影時点（時間経過とともに移動）としての1次情報の絶対的な比較となる。各撮影時点の間の時間間隔は任意に設定できるが、特に直近比法である連続する2つの撮影時点を選択する方法では各撮影時点の間の時間間隔は一定となるように設定することが好ましい。

[0097] 以下、第3の実施の形態の判定データ作成工程（S12）について、第1例から第3例まで、それぞれに分けて説明する。第1例から第3例のいずれにおいても、1次情報取得工程（S1221）は、第2の実施の形態の1次情報取得工程（S1211）と同じであるので説明は割愛する。

[0098] <第1例>

（統計指標値取得）

第1例では、前記の通り、図3Aに示すように、1次情報取得工程（S1221）で各撮影時点の1次情報を取得した後に、統計指標値取得工程（S1222）で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算する。統計指標値は、第1の実施の形態と同様に、1次情報を代表的に表す代表値として画定される指標値であって、たとえば総和、平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。総和は、複数の観測箇所の細胞数の総和、細胞の専有面積の総和、細胞の単体面積の総和、細胞間距離の総和である。平均値は、複数の観測箇所の細胞数の平均値、細胞密度の平均値、細胞数の専有面積の平均値、細胞の単体面積の平均値、細胞間距離の平均値である。分散と偏差は、複数の観測箇所の細胞数の分散と偏差、細胞密度

の分散と偏差、細胞の専有面積の分散と偏差、細胞の単体面積の分散と偏差、細胞間距離の分散と偏差である。ここで、統計指標値としての分散または偏差が培養容器内の細胞の均一性の指標であるので、統計指標値として総和または平均値を選択するよりも好適に継代のタイミングの判定を行うことができる点は第1の実施の形態と同様である。

[0099] (1次経時変化計算工程(1次経時変化指標値の取得))

続いて、1次経時変化計算工程(S1223)において、各撮影時点で計算された各1次情報の統計指標値から、1次経時変化指標値を計算する。1次経時変化指標値は、各撮影時点間、すなわち第1撮影時点と第2撮影時点との間および第2撮影時点と第3撮影時点との間における各1次情報の統計指標値の増分である変化量または変化率である。1次経時変化指標値は2つの1次情報の値について1つの1次経時変化指標値が作成され、全体として1次情報の統計指標値より1つ少ない1次経時変化指標値が作成される。観測箇所Opの数、または代表値された数より1つ少ない数の1次経時変化指標値を計算する。

[0100] これについて、図4Hと図4Iとを参照して説明する。図4Hおよび図4Iは第1例と第2例の場合について、時間(横軸)に対する値(縦軸)の変化の概念を示した図である。第1例の場合の縦軸は統計指標値であり、後述する第2例の場合の縦軸は一次情報の値である。図4Hおよび図4Iは、連続する3つの撮影時点(第1撮影時点と第2の撮影時点と第3撮影時点)の直近比法の例として示している。第1撮影時点と第2撮影時点と第3撮影時点とを連続する撮影時点として選択しない前述の基準比法の場合では、図4Hおよび図4Iについて、第1撮影時点と第2撮影時点と第3撮影時点との間に示されていない撮影時点があるものとして読み替えればよい。基準比法と直近比法との1次経時変化指標値の増加の傾向の特性については、第2の実施の形態と同様である。

[0101] 1次経時変化指標値の計算では、複数の撮影時点から2つの撮影時点(第1撮影時点と第2撮影時点)が選択される。図4Hおよび図4Iでは、最新

の連続する2つの撮影時点を第1撮影時点(t_1)と第2撮影時点(t_2)と第3撮影時点(t_3)として選択される例を示している。また、図4Hおよび図4Iでは、第1撮影時点(t_1)における統計指標値(a_1)が第2撮影時点(t_2)と第3撮影時点(t_3)とのそれぞれの撮影時点において、統計指標値(a_2)に増加している旨を示している。その撮影時点で継代のタイミングに至っているかを判定し、継代のタイミングに至っていなければ、再度新たな撮影時点を含めた最新の連続する3つの撮影時点が選択され、判定データを作成する。

[0102] 第1例では、1次経時変化指標値の計算は、判定に使用するために選択された3つの撮影時点の撮影時点間、すなわち3つの撮影時点から選択される2つの撮影時点に注目して1次経時変化指標値を計算する。すなわち、3つの撮影時点から、2つの撮影時点からなる2組の撮影時点を抽出して、その間における値の変化を1次経時変化指標値として計算する。第1例では、たとえば、1組目としての2つの撮影時点(第1撮影時点と第2撮影時点)と、2組目の2つの撮影時点(第2撮影時点と第3撮影時点)とを選択し、この間の1次経時変化指標値を計算する。この明細書では、判定に使用される撮影時点から抽出される2つの撮影時点を注目撮影時点とよぶものとする。第2の実施の形態では注目撮影時点の組み合わせは1組であるので1つの経時変化指標値のみが取得される。しかし、本実施の形態では、2点の注目撮影時点から1個の1次経時変化指標値が得られるから、2つの撮影時点からなる2組の注目撮影時点のそれぞれから1個ずつ、合計で2個の1次経時変化指標値が得られることになる。つまり、判定に使用するために選択された撮影時点が3個である場合には、ここから抽出される注目撮影時点の組み合わせは2組となり、1次経時変化指標値の個数は2個となる。

[0103] 注目する2つの撮影時点のそれぞれの撮影時点間での1次経時変化指標値の計算の仕方は、第2の実施の形態と同様である。1次経時変化指標値は、たとえば、注目撮影時点のうち評価撮影時点における1次情報の統計指標値と基準になる撮影時点における1次情報の統計指標値との差分量とすること

もできる。すなわち、1次経時変化指標値は、図4Hに示すように、注目撮影時点の組み合わせである、第1撮影時点（基準撮影時点）と第2撮影時点（評価撮影時点）との間、および第2撮影時点（基準撮影時点）と第3撮影時点（評価撮影時点）との間のそれぞれにおける1次情報の統計指標値の差分量の値である差分変化量とすることができる。この差分変化量の経時指標値では、第1撮影時点における1次情報の統計指標値に対する第2撮影時点の1次情報の統計指標値の差分量である差分変化量（ $a_2 - a_1$ ）、（ $a_3 - a_2$ ）とすることができる。

[0104] また、1次経時変化指標値は、注目撮影時点のうち基準になる撮影時点における1次情報の統計指標値に対する評価撮影時点における1次情報の統計指標値の割合変化量とすることもできる。この割合変化量の1次経時変化指標値では、第1撮影時点（基準撮影時点）における1次情報の統計指標値に対する第2撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値の変化率 a_2 / a_1 、第2撮影時点（基準撮影時点）における1次情報の統計指標値に対する第3撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値の変化率 a_3 / a_2 となる。これは、それぞれ、第2撮影時点での細胞数の総和の第1撮影時点での細胞数の総和に対する割合の値、および第3撮影時点での細胞数の総和の第2撮影時点での細胞数の総和に対する割合を意味する。

[0105] また、1次経時変化指標値は、注目撮影時点のうち、評価撮影時点における1次情報の統計指標値と基準になる撮影時点における1次情報の統計指標値との差分量の基準になる撮影時点における1次情報の統計指標値に対する差分割合変化量とすることもできる。差分割合変化量の1次経時変化指標値では、第1撮影時点の1次情報の統計指標値と第2撮影時点の1次情報の統計指標値との間の増分量の第1撮影時点における1次情報の統計指標値に対する割合である $(a_2 - a_1) / a_1$ 、第2撮影時点の1次情報の統計指標値と第3撮影時点の1次情報の統計指標値との間の増分量の第2撮影時点における1次情報の統計指標値に対する割合である $(a_3 - a_2) / a_2$ と表すことができる。たとえば、1次情報を細胞数とした例では、第1撮影時点から第2

撮影時点に至るまでの細胞数の総和の増分の第1撮影時点での細胞数の総和に対する割合の値、および第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの細胞数の総和の増分の第2撮影時点での細胞数の総和に対する割合を意味する。

[0106] さらに、図41に示すように、1次経時変化指標値は、注目撮影時点の時間間隔に対する、基準撮影時点における1次情報の統計指標値と評価撮影時点における1次情報の統計指標値とについての前記の差分変化量、割合変化量および差分割合変化量とすることもできる。すなわち、1次経時変化指標値は、2組の撮影時点（第1撮影時点および第2撮影時点と第2撮影時点および第3撮影時点）におけるそれぞれの時間間隔に対する、第1撮影時点（基準撮影時点）における1次情報の統計指標値と第2撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値とについての、および第2撮影時点（基準撮影時点）における1次情報の統計指標値と第3撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値とについての、差分変化量、割合変化量および差分割合変化量とすることもできる。この1次経時変化指標値は、第1撮影時点（基準評価時点）および第2撮影時点（評価撮影時点）に対しては、差分変化量の単位時間変化率 $(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)$ 、割合変化量の単位時間変化率 $(a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)])$ 、差分割合変化量の単位時間変化率 $(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$ と表すことができる。第2撮影時点（基準評価時点）および第3撮影時点（評価撮影時点）に対しては、差分変化量の単位時間変化率 $(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)$ 、割合変化量の単位時間変化率 $(a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)])$ 、差分割合変化量の単位時間変化率 $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ と表すことができる。これらの1次経時変化指標値は、いずれも第1撮影時点（基準撮影時点）と第2撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値の単位時間当たりの増加率、第2撮影時点（基準撮影時点）と第3撮影時点（評価撮影時点）における1次情報の統計指標値の単位時間当たりの増加率を意味し、同時に増加速度でもある。1次情報を細胞数とした例では、細胞数の単位時間当たりの増加率、すなわち増加速度（増殖速度）である。ここでいう、増加速度（増殖速度）は2

つの撮影時点における統計指標値を線形近似して得られる差分値として近似された単純速度である。

[0107] 増加速度（増殖速度）は、第2の実施の形態と同様に、1次情報の統計指標値の経時変化を現す限り、広くさまざまな定義に基づいて画定することができる。すなわち、図4Jに示すように、1次経時変化指標値としての増加速度（増殖速度）は、第2の実施の形態と同様に、時間に対する差分量で画定される単純速度ではなく比増殖速度とすることもできる。比増殖速度の定義については、第2の実施の形態と同様である。したがって、第2の実施の形態における説明が適用される。再度、確認的に説明すると、下記のとおりである。ここで、1次経時変化指標値の計算における基準時点を基準撮影時点として第1撮影時点 t_1 とし、1次経時変化指標値の計算における評価時点となる各評価撮影時点である撮影時点 t_i における1次情報の統計指標値 a_i [$i = 2 \sim n$]は、第1撮影時点 t_1 の1次情報の統計指標値が a_1 との間に、近似される一般化された関係として $a_i/a_1 = e^{[\mu_i] \cdot (t_i - t_1)}$ の関係が成立するように変化するものとして近似できる。ここで、 μ_i は撮影時点 t_i [$i = 2 \sim n$]における比増殖速度であり、 $\mu_i = [\ln(a_i/a_1)] / (t_i - t_1)$ となる。

[0108] ここで、撮影時点 t_i [$2 < i < n$]のうち、 $i = k_1$ [$2 < k_1 < n$]において1次情報の統計指標値が a_{k_1} となるとすると、比増殖速度は $\mu_{k_1} = [\ln(a_{k_1}/a_1)] / (t_{k_1} - t_1)$ となる。また、撮影時点 t_i [$i < n$]のうち、 $i = k_2$ [$k_1 < k_2 < n$]のときの評価撮影時点において1次情報の統計指標値が a_{k_2} となるとすると、比増殖速度は $\mu_{k_2} = [\ln(a_{k_2}/a_{k_1})] / (t_{k_2} - t_{k_1})$ となる。これらの比増殖速度 μ_{k_2} 、 μ_{k_1} を使用しての後述する2次経時変化指標値は、このように3つの時点の間から選択される2つの時点における値から算出される2つの比増殖速度 μ_{k_2} 、 μ_{k_1} から算出される。

[0109] さらに、第2の実施の形態と同様に、1次経時変化指標値として倍加時間を使用することができる。すなわち、撮影時点 t_i [$2 < i < n$]のうち、 $i = k_1$ [$2 < k_1 < n$]における1次情報の統計指標値 a_{k_1} が基準撮影時点である

第1撮影時点 t_1 の統計指標値 a_1 の2倍になったと仮定する ($a_{k1} = 2 a_1$)。このとき、基準撮影時点である第1撮影時点 t_1 から評価撮影時点である第 k_1 撮影時点 t_{k1} [$2 < k_1 < n$] までの時間が、いわゆる倍加時間 t_{ad1} ($= t_{k1} - t_1$) となる。なお、参考として、このときには $a_{k1}/a_1 = e^{(\mu_{k1} \cdot t_{ad1})} = 2$ の関係が成立するから、倍加時間 t_{ad1} における比増殖速度は特に、 $\mu_{k1} = \ln 2 / t_{ad1} = \ln 2 / (t_{k1} - t_1)$ となる。

[0110] そして、同様に、撮影時点 t_i [$i < n$] のうち、 $i = k_2$ [$k_1 < k_2 < n$] のときの評価撮影時点における1次情報の統計指標値 a_{k2} が、第 k_1 撮影時点 t_{k1} を基準撮影時点としたときの第 k_1 撮影時点 t_{k1} の統計指標値 a_{k1} の2倍になったと仮定する ($a_{k2} = 2 a_{k1}$)。このとき、基準撮影時点である第 k_1 撮影時点 t_{k1} から評価撮影時点である第 k_2 撮影時点 t_{k2} までの時間が、いわゆる倍加時間 t_{ad2} ($= t_{k2} - t_{k1}$) となる。ここでも、参考として、 $a_{k2}/a_{k1} = e^{(\mu_{k2} \cdot t_{ad2})} = 2$ の関係が成立するから、倍加時間 t_{ad2} における比増殖速度は特に、 $\mu_{k2} = 2 / (\ln 2 \cdot t_{ad2}) = \ln 2 / (t_{k2} - t_{k1})$ となる。倍加時間としての後述する2次経時変化指標値は、このように3つの時点の間から選択される2つの時点における値から算出される2つの倍加時間 t_{ad1} ($= t_{k1} - t_1$) と倍加時間 t_{ad2} ($= t_{k2} - t_{k1}$) とから求められる。

[0111] さらに、第2の実施の形態と同様に、倍加時間に加えて、増加速度（増殖速度）として、評価時点の量が基準時点の量の所定の倍数になるまでに必要な所定倍加時間 ($t \times i$) を採用することができる。すなわち、前記の例で、仮に、撮影時点 t_i [$2 < i < n$] のうち、 $i = k_1$ [$2 < k_1 < n$] における1次情報の統計指標値 a_{k1} が基準時点となる撮影時点 t_1 における1次情報の統計指標値 a_1 の所定の倍率 (X 倍) となり、 $i = k_2$ [$k_1 < k_2 < n$] のときの評価撮影時点における1次情報の統計指標値 a_{k2} が基準時点となる撮影時点 t_{k1} における1次情報の統計指標値 a_{k1} の所定の倍率 (X 倍) となるとすると、単位時間当たりの増加倍率が e^{μ_i} であるならば、 $e^{(\mu_i) \cdot (t \times i)} = X$ の関係が成立し、 $i = k_1$ および $i = k_2$ のそれぞれにおいて、所定倍加時間 $t \times_{k1} = \ln X / \mu_{k1} = (\ln X) \cdot (t_{k1} - t_1) / \ln (a_{k1}/a_1)$ と、 $t \times_{k2} = \ln X$

$$/\mu_{k2} = (\ln X) \cdot (t_{k2} - t_{k1}) / \ln(a_{k2}/a_{k1})$$
と、が得られる。第2の実施の形態と同様に、前記の倍加時間は、 $X = 2$ のときの所定倍加時間である。これらの所定倍加時間を使用しての後述する2次経時変化指標値は、このように3つの時点の間から選択される2つの時点における値から算出される2つの所定倍加時間から算出される。

[0112] (2次経時変化計算工程(1次経時変化指標値の取得))

続いて、2次経時変化計算工程(S1224)において、1次経時変化指標値から2次経時変化指標値を計算する。2次経時変化指標値には、1次経時変化指標値の増分量の指標としての差分変化量、割合変化量、単位時間当たりの単位時間変化率を、それぞれ適用することができる。すなわち第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値(変化前値)と、第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間における各1次経時変化指標値(変化後値)の差分変化量または割合変化量を適用することができる。

[0113] 2次経時変化指標値に差分変化量を適用する場合には、たとえば、図4Hに示すように、1次経時変化値として統計指標値の差分変化量を選択して、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値(変化前値)および第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値(変化後値)をそれぞれ統計指標値の差分変化量 $a_2 - a_1$ 、 $a_3 - a_2$ を取得しているときには、2次経時変化指標値は、変化後値から変化前値を差し引いた差分変化量 $(a_3 - a_2) - (a_2 - a_1) = (a_3 - 2a_2 + a_1)$ とすることができる。

また、2次経時変化指標値に差分変化量を適用とする場合に、1次経時変化値として統計指標値の割合変化量を選択して、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値(変化前値)および第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値(変化後値)を統計指標値の割合変化量 a_2/a_1 、 a_3/a_2 を取得しているときには、2次経時変化指標値はそれらの割合変化量の差分変化量である $(a_3/a_2) - (a_2/a_1)$

1) とすることができる。

2次経時変化指標値に差分変化量を適用する場合に、1次経時変化値として統計指標値の差分割合変化量を選択して、 $(a_2 - a_1) / a_1$, $(a_3 - a_2) / a_2$ を取得しているときには、2次経時変化指標値はそれらの割合変化量の差分変化量である $[(a_3 - a_2) / a_2 - (a_2 - a_1) / a_1]$ とすることができる。

さらに、2次経時変化指標値に差分変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値に差分変化量の単位時間変化率を選択して、 $(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)$, $(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)$ を取得したときには、図4 Iに示すように、2次経時変化指標値は、それぞれ、それらの単位時間変化率の差分変化量である $[(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)] - [(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)]$ とすることができる。

また、2次経時変化指標値に差分変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値に割合変化量の単位時間当たりの変化率を選択して、 $a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$, $a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$ を取得したときには、図4 Iに示すように、2次経時変化指標値は、それぞれ、それらの単位時間変化率の差分変化量である $a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)] - a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$ とすることもできる。

2次経時変化指標値に差分変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値に差分割合変化量の単位時間当たりの変化率を選択して、 $(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$, $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ を取得したときには、図4 Iに示すように、2次経時変化指標値は、それぞれ、それらの単位時間変化率の差分変化量である $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)] - (a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$ とすることもできる。

2次経時変化指標値に差分変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に比増殖速度を選択したときには、図4 Jに示すように、2次経時変化指標値は、差分変化量として、 $(\mu_{k2} - \mu_{k1}) = [\ln(a_{k2}/a_{k1})] / (t_{k2} - t_{k1}) - [\ln(a_{k1}/a_1)] / (t_{k1} - t_1)$ となる。

2次経時変化指標値に差分変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に倍加時間を選択したときには、図4Jに示すように、2次経時変化指標値は、差分変化量として、 $t_{ad2} - t_{ad1} = (t_{k2} - t_{k1}) - (t_{k1} - t_1) = t_{k2} - t_1$ となる。

[0114] また、2次経時変化指標値に割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値を統計指標値の差分値である差分変化量を選択して、 $(a_2 - a_1)$ 、 $(a_3 - a_2)$ を取得しているときには、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化前値）に対する第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化後値）の割合として、 $(a_3 - a_2) / (a_2 - a_1)$ とすることができる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値を統計指標値の割合変化量を選択して、 (a_2 / a_1) 、 (a_3 / a_2) を取得しているときには、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化前値）に対する第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化後値）の割合として、 $(a_3 / a_2) \div (a_2 / a_1) = (a_1 \cdot a_3) / a_2^2$ とすることができる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を統計指標値の差分割合変化量を選択して、 $(a_2 - a_1) / a_1$ 、 $(a_3 - a_2) / a_2$ を取得しているときには、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化前値）に対する第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値（変化後値）の割合として、 $(a_3 - a_2) / a_2 \div (a_2 - a_1) / a_1 = [a_1 \cdot (a_3 - a_2)] / [a_2 \cdot (a_2 - a_1)]$ とすることができる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を差分変化量の単位時間変化率を選択して、 $(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)$ 、 $(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)$ を取得したときには、 $[(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)] / [(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)] = [(a_3 - a_2) \cdot (t_2 - t_1)] / [(a_2 - a_1) \cdot (t_3 - t_2)]$ とすることができる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を割合変化量の単位時間変化率を選択して $a_2/[a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$, $a_3/[a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ を取得しているときには、2次経時変化指標値を、 $[(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)] \div [(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)] = [(a_3 - a_2) \cdot (t_2 - t_1) / (t_3 - t_2) \cdot (a_2 - a_1)]$ とすることができる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に差分割合変化量の単位時間当たりの変化率を選択して、 $(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$, $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ を取得したときには、2次経時変化指標値は $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)] \div (a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$ とすることもできる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に比増殖速度を選択したときには、図4 Jに示すように、2次経時変化指標値は、割合変化量として、 $\mu_{k2} / \mu_{k1} = (t_{k1} - t_1) \cdot [\ln(a_{k2} / a_{k1})] / (t_{k2} - t_{k1}) \cdot [\ln(a_{k1} / a_1)]$ となる。

2次経時変化指標値に割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に倍加時間を選択したときには、図4 Jに示すように、2次経時変化指標値は、差分変化量として、 $t_{ad2} / t_{ad1} = (t_{k2} - t_{k1}) / (t_{k1} - t_1)$ となる。

[0115] 同様に、2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を統計指標値の差分値である差分変化量を選択して、 $(a_2 - a_1)$, $(a_3 - a_2)$ を取得しているときには、2次経時変化指標値は、 $[(a_3 - a_2) - (a_2 - a_1)] / (a_2 - a_1) = (a_3 - 2a_2 + a_1) / (a_2 - a_1)$ とすることができる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を統計指標値の割合変化量を選択して、 (a_2 / a_1) , (a_3 / a_2) を取得しているときには、2次経時変化指標値は、 $[(a_3 / a_2) - (a_2 / a_1)] / (a_2 / a_1)$ とすることができる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指

標値を統計指標値の差分割合変化量を選択して、 $(a_2 - a_1) / a_1$, $(a_3 - a_2) / a_2$ を取得しているときには、2次経時変化指標値は、 $\{[(a_3 - a_2) / a_2] - [(a_2 - a_1) / a_1]\} / (a_2 - a_1) / a_1$ とすることができる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を差分変化量の単位時間変化率を選択して、 $(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)$, $(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)$ を取得したときには、 $\{[(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)] - [(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)]\} / (a_2 - a_1) / (t_2 - t_1) = \{[(a_3 - a_2) / (t_3 - t_2)] - [(a_2 - a_1) / (t_2 - t_1)]\} \cdot (t_2 - t_1) / (a_2 - a_1)$ とすることができる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用する場合に、1次経時変化指標値を割合変化量の単位時間変化率を選択して、 $a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$, $a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ を取得しているときには、2次経時変化指標値を、 $\{a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)] - a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]\} / a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)] = \{a_3 / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)] - a_2 / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]\} \cdot [a_1 \cdot (t_2 - t_1)] / a_2$ とすることができる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に差分割合変化量の単位時間当たりの変化率を選択して、 $(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]$, $(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]$ を取得したときには、2次経時変化指標値は、それぞれ、それらの単位時間変化率の差分変化量である $\{[(a_3 - a_2) / [a_2 \cdot (t_3 - t_2)]] - [(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]]\} / \{(a_2 - a_1) / [a_1 \cdot (t_2 - t_1)]\}$ とすることもできる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化指標値に比増殖速度を選択したときには、図4Jに示すように、2次経時変化指標値は、差分変化量として、 $(\mu_{k2} - \mu_{k1}) / \mu_{k1} = \{[\ln(a_{k2} / a_{k1})] / (t_{k2} - t_{k1}) - [\ln(a_{k1} / a_1)] / (t_{k1} - t_1)\} / [\ln(a_{k1} / a_1)] / (t_{k1} - t_1)$ となる。

2次経時変化指標値に差分割合変化量を適用とする場合に、1次経時変化

指標値に倍加時間を選択したときには、図4 Jに示すように、2次経時変化指標値は、差分変化量として、 $(t_{ad2} - t_{ad1}) / t_{ad1} = [(t_{k2} - t_{k1}) - (t_{k1} - t_1)] / (t_{k1} - t_1) = (t_{k2} - t_1) / (t_{k1} - t_1)$ となる。

[0116] さらに、1次経時変化指標値に、比増殖速度および倍加時間を選択したときに、2次経時変化指標値に単位時間変化率を適用とすることもできる。この場合も、上記と同様に、2次経時変化指標値を計算すればよいので、ここでは割愛する。

[0117] 2つの1次経時変化指標値について1つの2次経時変化指標値が作成されるので、全体として、1次経時変化指標値の数より1つ少ない2次経時変化指標値が作成され1次情報の統計指標値より2つ少ない2次経時変化指標値が作成されることになる。観測箇所O pの数、または代表値化された数より2つ少ない数の2次経時変化指標値が取得される。以上で、判定データ作成工程(S 12)を終了し、上記で得られた2次経時変化指標値を判定データとする。複数の2次経時変化指標値をそのままの数の複数の判定データとしてもよいし、平均値、最大値、最小値などにより複数の2次経時変化指標値を一の経時変化指標値として、それを一の判定データとしてもよい。

[0118] 1次経時変化指標値を介しているとはいえ、第1例における2次経時変化指標値は、第2の実施の形態と同様に、1次情報の経時要素を表している情報であり、培養容器内から選択される所定の複数の地点における所定の観測箇所O pの培養面の細胞の状態を定量的に示す。第1例は、所定の観測箇所O pの箇所における統計指標値としての総和の経時変化指標値となり、培養容器内で細胞が伸展または増殖できる余地を正確に表しうる代表値である。1次情報である細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間距離等のそれぞれの選択と、統計指標値である総和、平均値、分散、偏差のそれぞれの選択とに応じて、経時変化指標値を計算すればよい。第1例の判定データは、統計指標値として総和または平均値を選択した場合においては1次情報の代表値の変化の加速度の代表値を意味し、統計指標値として分散や偏差を選択した場合においては、1次情報のばらつきの変化の加速度を意

味することになる。

[0119] (継代判定)

判定データ作成工程 (S 1 2) で判定データの作成が完了した後は、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程 (S 1 3) を実行する。判定工程 (S 1 3) では、判定データ作成工程 (S 1 2) で作成した判定データに基づいて、継代のタイミングの判定を行う。判定工程 (S 1 3) では、経時変化計算工程 (S 1 2 1 3) で計算された 2 次経時変化指標値たる判定データと所定の閾値とを比較する。ここで、判定データが所定の閾値に至ったときを継代のタイミングに至ったものと判定する点も第 2 の実施の形態と同様である。第 3 の実施の形態の第 1 例でも、継代のタイミングには、2 次経時変化指標値の時間変化において、極小値、極大値などの極値に代表される何らかの変曲点が出現する。このような時間変化の変曲点が現れた時点を経代のタイミングに到達した時点として閾値として設定する。

[0120] 第 2 の実施の形態と同様に、判定データの数を 1 つとした場合には、その 1 つの判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定する。判定データの数を複数とした場合には、その複数の判定データのうちの所定の数の判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定することができる。

さらには、その複数の判定データのうちのすべての判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。この場合には、継代のタイミングに至っているかが比較的遅めに判断することとなる。

逆に、その複数の判定データのうちの少なくとも 1 つの判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。

- [0121] 所定の閾値は、基準比法の場合は、第1の実施の形態および第2の実施の形態と同様である。第1の実施の形態と同様に、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、細胞の伸展または増殖が現れなくなる継代のタイミングとなる時点における統計指標値についての1次経時変化指標値と2次経時変化指標値とを求めて、これを所定の閾値として画定する。経時変化の要素を加えたとしても、継代のタイミングの判定における統計指標値がもつ特徴は失われず、第1の実施の形態および第2の実施の形態で説明した態様と同様である。
- [0122] また、3つの撮影時点について、連続する3つの撮影時点として選択する直近比法の場合では、所定の閾値は以下の通りとなる。前記の通り、2次経時変化指標値は、1次経時変化指標値の増分である。第2の実施の形態で説明したとおり、1次経時変化指標値は1次情報の統計指標値の増分であるので、1次経時変化指標値は初期状態において徐々に増加しある時点では細胞の伸展または増殖が急激に大きくなるように増加する。そして、その後、その増加率は徐々に減少し、継代のタイミングに至ると極大値をとって減少に転じる傾向をもつ。したがって、2次経時変化指標値は、初期状態の1次経時変化指標値の増加の傾向の増加に合わせて徐々に増加して正の極大値を取り、2次経時変化指標値の減衰に合わせて徐々に減少する。そして、継代のタイミングに至る1次経時変化指標値の極大値のときに、2次経時変化指標値は逆に負の極小値として増加に転じる傾向をもつ。したがって、この極小値を所定の閾値として設定する。また、第2の実施の形態と同様に、2次経時変化指標値が所定の閾値に至ったときには継代のタイミングに到達してしまっているので、それよりも少し前の時点が継代に最も適したタイミングといえる。したがって、所定の閾値を「2次経時変化指標値の極小値にマージン値 α を加算した値（「2次経時変化指標値の極小値」＋「マージン値 α 」）として設定することができる。これにより、継代のタイミングにきわめて近い時点でまだ細胞の伸展または増殖に鈍化がみられない細胞が良好な状態で継代のタイミングに至っているか否かを判定することができる。第2の実

施の形態と同様に、「マージン値 α 」も予め実施する検定としての試験で設定する。

[0123] <第2例>

続いて、図4 Bを参照して、第2例について説明する。第1例（図4 A）では1次情報取得工程（S 1 2 2 1）の各撮影時点で1次情報を取得した後に、統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算する。そして、1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）において1次経時変化指標値を計算した後に、2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）において2次経時変化指標値を計算して判定データとした。しかし、第2例では、1次情報取得工程（S 1 2 2 1）で各撮影時点の1次情報を取得した後に、1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）を実行して1次情報の経時変化指標値を計算し、それに続いて2次経時変化指標値を計算する。すなわち、第1例に対して、1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）と2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）とを組み合わせ、1次情報取得工程（S 1 2 2 1）の直後に移動している点異なる。そして、その後に統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）で2次経時変化指標値の統計指標値を計算して判定データとする。1次情報および1次情報取得工程（S 1 2 2 1）は第1の実施の形態および第1例と同様であるので割愛する。

[0124] （1次経時経時変化計算工程（経時変化指標値の取得））

1次情報取得工程（S 1 2 2 1）に続いて、1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）において、各撮影時点で計算され各1次情報の1次経時変化指標値を計算する。第1例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）では統計指標値の1次経時変化指標値を取得するところ、第2例の1次情報取得工程（S 1 2 2 1）では、1次情報の1次経時変化指標値を取得する。したがって、第1例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）の統計指標値を1次情報と読み替えて第1例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）を適用すれば、第2例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）となる。1次経時変化指標値は、各撮影時点間の1次情報の変化量である。

また、第2例における1次経時変化指標値は、第1例と同様に差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間である。第1例では1次情報の統計指標値の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間であるのに対し、第2例では1次情報の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間である点異なるのみである。したがって、前述の第1例での1次経時変化指標値の算出において、1次情報の統計指標値から1次経時変化指標値を算出するところ、「1次情報の統計指標値」を単に「1次情報」と読み替えて、第1例を第2例に適用すれば良い。また、第2例でも、第1例と同様に、変化速度は比増殖速度として適用することが可能であって、変化時間は倍加時間として適用することが可能である。

さらに、これについて、図4Hおよび図4Iを参照して説明する。図4Hと図4Iとは第1例と第2例の場合について、時間（横軸）に対する一次情報（縦軸）の経時変化である1次経時変化と、の概念を示した図である。図4Hは1次経時変化指標値が変化量または変化率である場合を示し、図4Iは1次経時変化指標値が単位時間あたりの変化量または変化率である場合を示している。図4Hと図4Iのいずれも、ここで説明する1次経時変化計算工程（S1223）において計算される1次経時変化指標値と、次に説明する2次経時変化計算工程（S1224）において計算される2次経時変化指標値とを同時に示している。第2例では、前記の第1例の1次経時変化計算工程（S1223）の説明および図4Hと図4Iにおける統計指標値としての a_1 、 a_2 を、1次情報取得工程（S1221）で取得された1次情報の値と読み替えればよい。2個の1次情報から1個の1次情報が得られるので、1次経時変化指標値は、1次情報の個数から1個減じた個数に対応した個数の1次経時変化指標値が得られる。第2例の1次経時変化指標値は、1次情報の経時変化傾向を直接的に示す値である。

[0125]（2次経時経時変化計算工程（経時変化指標値の取得））

1次経時変化計算工程（S1222）に続いて、2次経時変化計算工程（

S 1 2 2 3) において、2次経時変化指標値を計算する。第2例では、前記の第1例の統計指標値を1次情報と読み替えて、第1例と同様のプロセスを適用する。2次経時変化指標値は、第1例と同じく、1次経時変化指標値の増分である変化量または変化率である。すなわち、第1撮影時点から第2撮影時点に至るまでの間の1次経時変化指標値と、第2撮影時点から第3撮影時点に至るまでの間における各1次経時変化指標値の変化量である。これについて、図4Hと図4Iとを参照して説明する。図4Hと図4Iとは第1例と第2例の場合について、時間（横軸）に対する一次情報（縦軸）の変化の概念を示した図である。図4Hと図4Iのいずれも、1次経時変化指標値に併せて、2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）において計算される2次経時変化指標値を示している。第2例の2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）では1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）により2次経時変化指標値を取得するものであるので、前記1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）と同様に、第1例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）の統計指標値を1次情報と読み替えて第1例の2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）を適用すれば、第2例の2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）となる。2つの1次経時変化指標値について1つの2次経時変化指標値が作成されるので、全体として、1次経時変化指標値の数より1つ少ない2次経時変化指標値が作成され1次情報の統計指標値より2つ少ない2次経時変化指標値が作成される点も第1例と同様である。

[0126] （統計指標値取得）

2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）により、2次経時変化指標値を計算した後に、統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算する。第2例における統計指標値は、2次経時変化指標値を代表的に表す代表値として画定される指標値である。統計指標値は、第1の実施の形態および第2の実施の形態と同様に、平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。第2例では、2次経時変化指標値の統計指標値を算出するものであるので、複数の観測箇所Opの

それぞれにおける２次経時変化指標値の平均値、分散、偏差などである。ここで求めた統計指標値を判定データとして、継代のタイミングの判定を行う。複数の統計指標値をそのままの数の複数の判定データとしてもよいし、平均値、最大値、最小値などにより複数の統計指標値を一の統計指標値として、それを一の判定データとしてもよい。第２例の統計指標値取得工程（Ｓ１２２２）で計算される２次経時変化指標値の統計指標値は、第２の実施の形態の第２例における経時変化指標値の統計指標値である判定データと同様の性質および技術的意義を持っている。

[0127] （継代判定）

判定データ作成工程（Ｓ１２）において、判定データの作成が完了した後には、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程（Ｓ１３）を実行する。判定工程（Ｓ１３）では、判定データ作成工程（Ｓ１２）で作成した統計指標値に基づいて、継代のタイミングの判定を行う。第２例の判定データは、２次経時変化指標値の統計指標値として、１次情報と、１次経時変化指標値と２次経時変化指標値である経時変化の要素と、統計指標値の要素が含まれているので、継代のタイミングの判定を行う判定データとしては第２の実施の形態の第２例および本実施の形態の第１例と変わらず、継代のタイミングの判定を行う上では有効である。第２例の判定データは、統計指標値として総和または平均値を選択した場合においては１次情報の変化の加速度の代表値を意味し、統計指標値として分散や偏差を選択した場合においては、１次情報の変化の加速度のばらつきを意味することになる。

[0128] 判定工程（Ｓ１３）では、統計指標値取得工程（Ｓ１２２２）で計算された統計指標値と所定の閾値とを比較する。所定の閾値は第１例と同様である。第１の実施の形態と同様に、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、継代のタイミングとなる時点における統計指標値を取得して、経時変化指標値を求めて、これを所定の閾値として画定する。経時変化の要素を加えたとしても、継代のタイミングの判定における統計指標値がもつ特徴は失われず、第１の実施の形態で

説明したとおりである。

判定データの数について、1の代表値として作成した場合には、判定データの数をもつとした場合には、その1つの判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定する。判定データの数をもつとした場合には、その複数の判定データのうちの所定の数の判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定することができる。第3の実施の形態の第2例でも、継代のタイミングには、統計指標値の変化傾向において、極小値、極大値など極値に代表される何らかの変曲点が出現する。このような変化傾向の変曲点が現れた時点を継代のタイミングに到達した時点として閾値として設定する。

さらには、その複数の判定データのうちのすべての判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、すべての判定データが所定の閾値に至るまでの時間を要することになるので、継代のタイミングに至っているかを比較的遅めに判断することとなる。

逆に、その複数の判定データのうちの少なくとも1つの判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、一の判定データが所定の閾値に至れば判定できるので、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。

[0129] <第3例>

続いて、図4Cを参照して、第3例について説明する。第3例（図4C）では、1次情報取得工程（S1221）の各撮影時点で1次情報を取得した後、1次経時変化計算工程（S1223）において1次経時変化指標値を計算し、その後に統計指標値取得工程（S1222）で各撮影時点の1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算する。そして、2次経時変化計算工程（S1224）において統計指標値の2次経時変化指標値を計算して判定データとする。すなわち、1次経時変化計算工程（S1223）と2次経時変

化計算工程（S 1 2 2 4）との間に、統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）を実行して1次情報から各撮影時点の統計指標値を計算し、2次経時変化計算工程（S 1 2 2 4）では統計指標値の2次経時変化指標値を計算するものである。以下、これについて説明する。1次情報および1次情報取得工程（S 1 2 2 1）は第1の実施の形態と同様であるので割愛する。

[0130]（1次経時経時変化計算工程（経時変化指標値の取得））

1次情報取得工程（S 1 2 2 1）に続いて、1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）において、各撮影時点で計算され各1次情報の1次経時変化指標値を計算する。1次情報取得工程（S 1 2 2 1）と1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）とのプロセスは第2例（図4 B）と同様であるので、詳細な説明は割愛する。第3例においても、前記の第1例の1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）の説明および図4 Hと図4 Iにおける統計指標値としての a_1 、 a_2 を、1次情報取得工程（S 1 2 2 1）で取得された1次情報の値と読み替えばよい。

[0131]（統計指標値取得）

1次経時変化計算工程（S 1 2 2 3）により、1次情報の1次経時変化指標値を計算した後に、統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）で1次経時変化指標値の統計指標値を計算する。第3例における統計指標値は、1次経時変化指標値を代表的に表す代表値として画定される指標値である。統計指標値は、第1の実施の形態および第2の実施の形態と同様に、平均値、分散、標準偏差などの偏差の少なくともいずれかである。第3例では、1次経時変化指標値である差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間の統計指標値を求めることになる。すなわち、第3例では、これらの1次経時変化指標値の統計指標値を算出するものであるので、複数の観測箇所O pのそれぞれにおける1次情報の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間の平均値、分散、偏差などである。

[0132]（2次経時経時変化計算工程（経時変化指標値の取得））

統計指標値取得工程（S 1 2 2 2）に続いて、2次経時変化計算工程（S

1 2 2 4) において、2 次経時変化指標値を計算する。第 3 例では、第 2 例の 1 次経時変化指標値を統計指標値と読み替えて、第 2 例の 2 次経時変化計算工程 (S 1 2 2 4) と同様のプロセスを適用して 2 次経時変化取得工程 (S 1 2 2 4) を適用する。第 3 例では、2 次経時変化指標値は、1 次情報の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間 (1 次経時変化指標値) の平均値、分散、偏差 (統計指標値) の差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度または変化時間 (2 次経時変化指標値) となる。この統計指標値を判定データとして、継代のタイミングの判定を行う。複数の統計指標値をそのままの数の複数の判定データとしてもよいし、平均値、最大値、最小値などにより複数の統計指標値を一の統計指標値として、それを一の判定データとしてもよい。

[0133] (継代判定)

判定データ作成工程 (S 1 2) において、判定データの作成が完了した後は、継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程 (S 1 3) を実行する。判定工程 (S 1 3) では、判定データ作成工程 (S 1 2) で作成した統計指標値に基づいて、継代のタイミングの判定を行う。第 3 例の判定データは、統計指標値の 2 次経時変化指標値であるため、第 1 例および第 2 例と同様に、1 次情報と、1 次経時変化指標値と 2 次経時変化指標値である経時変化の要素と、統計指標値の要素が含まれている点は変わらないので、継代のタイミングの判定を行う判定データとしては第 2 の実施の形態および本実施の形態の第 1 例および第 2 例と変わらず、継代のタイミングの判定を行う上では有効である。第 3 例の判定データは、統計指標値として総和または平均値を選択した場合においては 1 次情報の変化の速度の代表値の速度を意味し、統計指標値として分散や偏差を選択した場合においては、1 次情報の変化の速度のばらつきの速度を意味することになる。

[0134] 判定工程 (S 1 3) では、2 次経時変化計算工程 (S 1 2 2 4) で計算された 2 次経時変化指標値と所定の閾値とを比較する。所定の閾値は第 1 例と同様である。第 1 の実施の形態と同様に、実際に第 3 例 (図 4 C) のプロセ

スと同じ継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験において、継代のタイミングとなる時点における1次情報の1次経時変化指標値を計算し、その統計指標値を計算して、そして統計指標値の2次経時変化指標値を計算して、これを所定の閾値として画定する。経時変化の要素を加えたとしても、継代のタイミングの判定における統計指標値がもつ特徴は失われず、第1の実施の形態で説明したとおりである。

判定データの数について、1の代表値として作成した場合には、判定データの数をもつとした場合には、その1つの判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定する。判定データの数をもつとした場合には、その複数の判定データのうちの所定の数の判定データが所定の閾値に至っているかを比較し、所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定することができる。

第3の実施の形態の第3例でも、継代のタイミングには、2次経時変化指標値の時間変化において、極小値、極大値などの極値に代表される何らかの変曲点が出現する。このような時間変化の変曲点が現れた時点をもつ継代のタイミングに到達した時点として閾値として設定する。

さらには、その複数の判定データのうちのすべての判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、すべての判定データが所定の閾値に至るまでの時間を要することになるので、継代のタイミングに至っているかを比較的遅めに判断することとなる。

逆に、その複数の判定データのうちの少なくとも1つの判定データが所定の閾値に至っている場合に、継代のタイミングに到達しているものと判定してもよい。この場合には、一の判定データが所定の閾値に至れば判定できるので、継代のタイミングに至っているかを早めに判断することができる。

[0135] [第4の実施の形態]

続いて、第4の実施の形態として、図5Aから図5Bを参照して、継代の

タイミング判定の方法およびそのシステムについて説明する。図5 Aは第4の実施の形態の注目撮影時点である i 個の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) およびそれらの1次情報に対応する値 R_i ($i = 1$ から m の自然数) と j 個の評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) およびそれらの1次情報に対応する値 V_j ($j = 1$ から n の自然数) との概念を示した図である。

[0136] 第3の実施の形態は、注目撮影時点について、一つの基準撮影時点と二つ以上の評価撮影時点のそれぞれとの間で、経時変化指標値を計算する形態であった。これに対し、第4の実施の形態では、二つ以上の基準撮影時点と二つ以上の評価撮影時点のそれぞれとの間で、経時変化指標値を計算する形態である。基準撮影時点の数と評価撮影時点の数とは、それぞれ一以上で自由に設定できる。すなわち、図5 Aに示すように、 i 個の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) と j 個の評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) とを注目撮影時点として自由に設定できる。この中で、1個の基準撮影時点と1個評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) とを注目撮影時点として設定した例が、前述の第2の実施の形態である。また、1個の基準撮影時点と2個評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) とを注目撮影時点として設定した例が、前述の第3の実施の形態である。

[0137] 第4の実施の形態では、特に、複数の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) を使用する点が第3の実施の形態と異なるが、複数の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) を使用する点を除いては、第3の実施の形態を同様に適用できる。第4の実施の形態において第3の実施の形態を適用する上で、2つの手法がある。一つは、1次経時変化指標値 (S_{1223}) を実行する際に、複数の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) で取得された1次情報に基づく統計指標値 (第1例の場合) と、複数の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) で取得された1次情報 (第2例と第3例の場合) とのそれぞれの場合について、代表値化を行って一つの代表基準値に統合して、第3の実施の形態を適用する手法 (以下、基準値統合法) である。他の一つは、複数の基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) で取得された1次情報に基づく統

計指標値（第1例の場合）と、複数の基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）で取得された1次情報（第2例と第3例の場合）とのそれぞれの場合について、一つの代表値に統合することなく、複数の基準値として、第3の実施の形態を適用する手法（以下、マトリックス経時変化法）である。

[0138] 図5Bは、基準値統合法の概念を示している。基準値統合法では、以下のように、代表基準値 R_{rep} を作成して、前述の第3の実施の形態を適用する。第3の実施の形態の第1例では、1次情報取得工程（S1221）において、複数の基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）で取得された1次情報の平均値、和、または重みづけ値などの統計手法により代表値化を行って、一つの1次情報の代表基準値 R_{rep} を作成する。また、第3の実施の形態の第2例および第3例では、1次情報取得工程（S1221）において、複数の基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）で取得された1次情報の統計指標値の平均値、和、または重みづけ値などの統計手法により代表値化を行って、一つの1次情報の代表基準値 R_{rep} を作成する。この時、1次情報の統計指標値も平均値、和、または重みづけ値などであるため、統計的处理が連続するが、代表基準値を作成するための代表値化と1次情報の統計指標値とは、技術的に別の意義を有する。前者は複数の基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）に対応する数の値を一の代表値に統合するため処理であり、後者はあくまでも、細胞の1次情報の状態を表す統計指標値を作成するための処理である。複数の基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）で取得された複数個の1次情報に基づく値 R_i （ $i = 1$ から m の自然数）を一つの代表基準値 R_{rep} に統合した後は、 j 個の評価撮影時点（ $j = 1$ から n の自然数）およびそれらの1次情報に対応する値 V_j （ $j = 1$ から n の自然数）との間で、1次経時変化指標値 $(R_{rep}, V_1) \cdots (R_{rep}, V_j) \cdots (R_{rep}, V_n)$ を計算するように、前記の第3の実施の形態を、第1例から第3例の前記のそれぞれの記載に従って、そのまま適用すればよい。

[0139] マトリックス経時変化法では、基準値統合法と異なり、一の基準値に代表

値化することなく、基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）の数に対応する数の 1 次情報に基づいて、前記の第 3 の実施の形態を、第 1 例から第 3 例のそれぞれにそって、そのまま適用すればよい。

[0140] 図 5 C は、マトリックス経時変化法概念を示している。すなわち、各基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）における 1 次情報に対応する値 R_i （ $i = 1$ から m の自然数）と各評価撮影時点（ $j = 1$ から n の自然数）における 1 次情報に対応する値 V_j （ $j = 1$ から n の自然数）から 1 次経時変化指標値を計算する概念を示している。

[0141] マトリックス経時変化法では、基準値統合法と異なり、一の代表基準値 R_{rep} に代表値化することなく、基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）の数に対応する数の 1 次情報に基づいて、前記の第 3 の実施の形態を、第 1 例から第 3 例のそれぞれにそって、そのまま適用すればよい。たとえば、基準撮影時点（ $i = 1$ から m の自然数）のそれぞれにおける 1 次情報から導かれる値を R_i （ $i = 1$ から m の自然数）と仮定する。この 1 次情報から導かれる値 R_i （ $i = 1$ から m の自然数）は、第 3 の実施の形態の第 1 例では統計指標値を、第 3 の実施の形態の第 2 例および第 3 例では 1 次経時変化指標値を、意味する。第 3 の実施の形態の第 1 例から第 3 例では、この m 個の値 R_i （ $i = 1$ から m の自然数）のそれぞれについて、 n 個の値 V_j （ $j = 1$ から n の自然数）のそれぞれとの間で、次の工程の $m \times n$ 個の 1 次経時変化指標値である R_1 に基づくセット $(R_1, V_1) \cdots (R_1, V_j) \cdots (R_1, V_n)$ と、 R_i （ $i = 1$ から m ）に基づくセット $(R_i, V_1) \cdots (R_i, V_j) \cdots (R_i, V_n)$ と、 R_m に基づくセット $(R_m, V_1) \cdots (R_m, V_j) \cdots (R_m, V_n)$ と、それぞれを計算し、これらのそれぞれから 2 次経時変化指標値を計算していくように、第 3 の実施の形態を適用する。第 3 の実施の形態では基準撮影時点は 1 個であったので、評価撮影時点の個数だけ 1 次経時変化指標値が生成され、それより 1 個少ない 2 次経時変化指標値が生成された。すなわち、評価撮影時点（ $i = 1$ から n の自然数）とした場合には、 n 個の 1 次経時変化指標値および $(n -$

1) 個の2次経時変化指標値が生成される。第4の実施の形態におけるマトリックス経時変化法では、これらに m 個を乗じた指標値、すなわち $(m \times n)$ 個の1次経時変化指標値および $m \cdot (n - 1)$ 個の2次経時変化指標値が生成される。

[0142] つまり、評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) のそれぞれにおける1次情報から導かれる値を V_i ($i = 1$ から m の自然数) と仮定すると、基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) のそれぞれにおける1次情報から導かれる値 R_i ($i = 1$ から m の自然数) と、評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) のそれぞれにおける1次情報から導かれる値 V_j ($j = 1$ から m の自然数) と、の間に、第3の実施の形態の第1例から第3例を適用する。1次情報から導かれる値を V_j ($j = 1$ から n の自然数) も、第3の実施の形態の第1例では統計指標値を、第3の実施の形態の第2例および第3例では1次経時変化指標値を、意味する。すなわち、基準撮影時点を1点 ($i = 1$) と、評価撮影時点を3点 ($j = 3$) とした場合が第3の実施の形態であり、基準比法の場合には $R_1 = a_1$, $V_1 = a_2$ および $R_1 = a_1$, $V_2 = a_3$ として、直近比法の場合には $R_1 = a_1$, $V_1 = a_2$ および $R_2 = a_2$, $V_2 = a_3$ となる。

[0143] マトリックス経時変化法では、第3の実施の形態の第1例か第3例のいずれにおいても、複数の基準撮影時点に対応する値の個数に基づいて、2次経時変化値が出来上がる。継代のタイミングに至っているかを判定する判定工程 (S13) で、所定の閾値を設定する際には、以下のように行うことができる。

[0144] 第4の実施の形態のマトリックス経時変化法であっても、所定の閾値は、実際の継代のタイミングの判定を行う前に予め同条件で事前の検定を実施し、その検定において、継代のタイミングとなった時点の結果から決定される。この検定では、実際の継代のタイミングの判定と同条件で実施するので、基準撮影時点 ($i = 1$ から m の自然数) の個数および評価撮影時点 ($j = 1$ から n の自然数) の個数も同じに設定する。そのため、第3の実施の形態の第1例か第3例を適用する上で、その検定においても、1次経時変化指標値

として、 R_1 に基づくセット $(R_1, V_1) \cdots (R_1, V_j) \cdots (R_1, V_n)$ と、 R_i ($i=1$ から m) に基づくセット $(R_i, V_1) \cdots (R_i, V_j) \cdots (R_i, V_n)$ と、 R_m に基づくセット $(R_m, V_1) \cdots (R_m, V_j) \cdots (R_m, V_n)$ と、をそれぞれ計算し、これらのそれぞれから2次経時変化指標値を計算して判定データを作成する。そして、継代のタイミングになったと判断される時点の判定データを作成する。これにおいて、判定データとしての2次経時変化指標値（第1例と第3例）および2次経時変化指標値の統計指標値（第2例）は、それぞれ複数の判定データができることになる。しかし、基準撮影時点が複数であっても、2次経時変化指標値（第1例と第3例）および2次経時変化指標値の統計指標値（第2例）の変化傾向のそれぞれには変曲点がみられ、この付近を継代のタイミングを判断する上での所定の閾値として画定される。特に、複数の基準撮影時点を設定する場合には、 R_1 に基づくセット、 R_i ($i=1$ から m) に基づくセット、 R_m に基づくセットの変化傾向自体にも変曲点を有するパターンが現れるので、経時変化要素を有する第2の実施の形態および第3の実施の形態よりも、正確な判定が可能となる。

[0145] 続いて、図5Dを参照して、第4の実施の形態の変形例である別の形態について説明する。図5Dは、培養の進行（横軸である「時間」の経過）とともに変化する判定データ（○印，●印）の値（縦軸）の値の変化の傾向を示している。図5Dにおいて○印は基準撮影時点に対応する値であり、●印は評価撮影時点に対応する値である。判定データ作成工程（S12）において、判定データを作成する際において、継代のタイミングが到来する前の細胞の伸展または増殖が進行している段階では、基準撮影時点に対応する値の増加傾向と評価撮影時点に対応する値の増加傾向は一定の増加傾向のばらつきの範囲内に収まる（図5Dの評価撮影時点に対応する値のA群）。しかし、継代のタイミングが到来すると、基準撮影時点に対応する値の増加傾向と評価撮影時点に対応する値の増加傾向は大きく増加傾向に変化が現れる。（図5Dの評価撮影時点に対応する値のB群）。したがって、判定データの作成

において、図5Dの評価撮影時点に対応する値のB群の傾向が出始めた評価撮影時点を継代のタイミングと判定するものである。図5Dの評価撮影時点に対応する値のB群の傾向が出始める時点は、判定データの変化傾向の変曲点である。

[0146] この場合、判定データ作成工程（S12）において、判定データの変化傾向の変曲点が出る段階をもって継代のタイミングと判定することもできる。これは第1の実施の形態に適用することができる。一方、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その検定試験において、判定データの変化傾向の変曲点が出る段階をもって所定の閾値として画定して、第1の実施の形態から第4の実施の形態を適用してもよい。

[0147] [第5の実施の形態]

続いて、第5の実施の形態として、図5Eを参照して、説明する。図5Eは、培養の進行（横軸である「時間」の経過）とともに変化する判定データ（○印）の値（縦軸）の値の変化の傾向を示している。第5の実施の形態は、第1の実施の形態から第4の実施の形態で説明した継代のタイミング判定の判定工程（S13）について、経時変化要素を利用する第2の実施の形態から第4の実施の形態のバリエーションとしての実施の兄弟である。すなわち、第5の実施の形態は、判定工程（S13）以外について、第2の実施の形態から第4の実施の形態のそれぞれの工程をそのまま適用し、第2の実施の形態から第4の実施の形態のそれぞれについて、判定工程（S13）につき、以下で説明する本実施の形態である第5の実施の形態の判定工程（S13）を適用するものである。

[0148] 第5の実施の形態の判定工程（S13）では、所定の閾値の判定において、機械学習または深層学習を利用する形態である。機械学習および深層学習の態様自体に制限はなく、広く一般的なすべての機械学習または深層学習を使用することができる。ここでは、機械学習および深層学習自体に特徴があるわけではなく、本願発明の第1の実施の形態から第4の実施の形態の継代のタイミングの判定に機械学習および深層学習を使用することにより、第2

の実施の形態から第4の実施の形態に加えて、さらに適時的な継代のタイミングの判定を行うことができる。

[0149] 図5Eは、第1の実施の形態から第4の実施の形態における1次情報としての細胞の数および統計指標値としての総和を例とした変化傾向で示している。この場合には、継代のタイミングまでは増加傾向であり、継代のタイミングが到来する箇所においてその変化傾向の変曲点を有している。そして、継代のタイミングが到来した後は増加が停止する変化傾向の飽和状態を示している。第1の実施の形態から第4の実施の形態における他の1次情報および他の統計指標値の変化傾向は図5に示したものと異なるが、継代のタイミングが到来する箇所においてその変化傾向の変曲点を有する点では変わりはない。以下、第5の実施の形態の説明としては、図5Eに示した変化傾向につき、継代のタイミングが到来する箇所において変化傾向の変曲点が現れ、その前後において、変化傾向に差がでる共通点として理解されたい。

[0150] 実際の継代のタイミングとなる時点は、図5Eの太い矢印で示す付近になる。この付近では、判定データ（○印）の変化傾向は変曲点になる。ただし、判定のタイミングは、培養の進行における所定の時間ごとに離散的に実施するため、変曲点に合致した時点で判定のタイミングを行うことはできない。経時変化要素を利用する第2の実施の形態から第4の実施の形態の場合においては、所定の閾値を画定するにあたり、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験の結果から所定の閾値を決定した。第5の実施の形態でも、実際に継代のタイミングの判定と同じ条件で予め検定としての試験を実施し、その試験の結果に、機械学習または深層学習を適用して所定の閾値を決定する。

[0151] 第2の実施の形態から第4の実施の形態では、検定の試験の結果の判断においては、いわば経験を有するユーザの感覚に基づいて、事前の判定を行うことになる。そこでは、図5Eにおいて、培養が進行している段階の変化傾向を示すライン L_1 と、培養が進行して継代のタイミングが到来した後の変化傾向を示すライン L_2 とを、感覚的に判断して、培養が進行している段階の変

化傾向を示すライン L_1 の交点あたりとなる変曲点の時点を経代のタイミングの時点と判断する。しかし、機械学習または深層学習を適用する第5の実施の形態では、経験を有するユーザでさえも認識できない変化傾向を捉えることが可能となる。たとえば、概念的には、図5Eの変化傾向を示すライン L_A のように、経験を有するユーザでさえも認識できない変化傾向を導きだし、機械学習や深層学習を使用しないでは得られない事前の経代のタイミングの時点を導きだすことが可能となる。第5の実施の形態では、この時点を経代の閾値として画定する。

[0152] 判定工程（S13）において、判定データが所定の閾値に至ったときを経代のタイミングに至ったものと判定する点は、第2の実施の形態から第4の実施の形態と同様である。

符号の説明

- [0153] 1 細胞培養システム
2 培地ユニット
3 経代タイミング判定ユニット
4 培養ユニット
5 細胞接種装置
6 移送ユニット
7 遠心装置
8 処理装置
31 カメラ（撮像手段）
32 撮影ステージ
33 処理手段
61 移動台
62 アーム
63 アクチュエータ
Pe 評価培養容器

請求の範囲

- [請求項1] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、
- 第1撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点における前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、
- 前記第1撮影時点における前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、
- 前記細胞の前記1次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、
- 前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、
- を備える継代タイミング判定方法。
- [請求項2] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、
- 第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、
- 前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、
- 前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、
- 前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値から経時変化指標値を計算する経時変化計算工程と、を備え、
- 前記経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点
- を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程

と、を備える継代タイミング判定方法。

[請求項3]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、

第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報から経時変化指標値を計算する経時変化計算工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、

前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法。

[請求項4]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、

第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそ

れぞれにおける前記 1 次情報の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、

前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記統計指標値の 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記統計指標値の 1 次経時変化指標値と、を計算する 1 次経時変化計算工程と、

前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記 1 次経時変化指標値と、から 2 次経時変化指標値を計算する 2 次経時変化計算工程と、

前記 2 次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法。

[請求項 5]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、

第 1 撮影時点および前記第 1 撮影時点以降の第 2 撮影時点および前記第 2 撮影時点以降の第 3 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、

前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得する 1 次情報取得工程と、

前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、前記第 2 撮影時点および前記第 3 撮影時点の前記 1 次情報の 1 次経時変化指標値と、を計算する 1 次経時変化計算工程と、

、

前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次経時変化指標

値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算する2次経時変化計算工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記2次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、

前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法。

[請求項6]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定方法であって、

第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得する撮像工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する1次情報取得工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、を計算する1次経時変化計算工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次経時変化指標値の統計指標値を計算する統計指標値取得工程と、

前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値と、から2

次経時変化指標値を計算する２次経時変化計算工程と、

前記２次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う判定工程と、を備える継代タイミング判定方法。

[請求項7]

請求項２に記載の継代タイミング判定方法であって、

前記経時変化指標値は、前記統計指標値の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度、または所定倍加時間である継代タイミング判定方法。

[請求項8]

請求項４に記載の継代タイミング判定方法であって、

前記１次経時変化指標値は、前記統計指標値の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度、または所定倍加時間である継代タイミング判定方法。

[請求項9]

請求項３に記載の継代タイミング判定方法であって、前記経時変化指標値は、前記１次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度、所定倍加時間である継代タイミング判定方法。

[請求項10]

請求項５に記載の継代タイミング判定方法であって、前記１次経時変化指標値は、前記１次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度、所定倍加時間である継代タイミング判定方法。

[請求項11]

請求項６に記載の継代タイミング判定方法であって、前記１次経時変化指標値は、前記１次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度、所定倍加時間である継代タイミング判定方法。

[請求項12]

請求項１から６のいずれか１項に記載の継代タイミング判定方法であって、

前記１次情報は、前記細胞画像の中の、細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間の相対距離のいずれかである継代

タイミング判定方法。

- [請求項13] 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記統計指標値は、平均値である継代タイミング判定方法。
- [請求項14] 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記統計指標値は、総和である継代タイミング判定方法。
- [請求項15] 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記統計指標値は、分散または偏差である継代タイミング判定方法。
- [請求項16] 請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、細胞の伸展または増殖が現れなくなる統計指標値として画定される継代タイミング判定方法。
- [請求項17] 請求項 15 に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記分散または前記偏差の時間変化における変曲点として画定される継代タイミング判定方法。
- [請求項18] 請求項 7 に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の 2 次経時変化指標値として画定される継代タイミング判定方法。
- [請求項19] 請求項 7 に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、

前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項20] 請求項8に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記2次経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経時変化指標値として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項21] 請求項8に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記2次経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項22] 請求項9または10に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記統計指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経時変化指標値として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項23] 請求項9または10に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記統計指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項24] 請求項11に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、

前記 2 次経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の 2 次経時変化指標値として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項25] 請求項 1 1 に記載の継代タイミング判定方法であって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、

前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記 2 次経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定方法。

[請求項26] 請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の継代タイミング判定方法であって、

前記第 1 撮影時点と前記第 2 撮影時点との時間間隔と、前記第 2 撮影時点と前記第 3 撮影時点との時間間隔とは、同じ時間間隔である継代タイミング判定方法。

[請求項27] 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の継代タイミング判定方法であって、

前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、機械学習により画定される継代タイミング判定方法。

[請求項28] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第 1 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点における前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、

前記処理装置は、前記第 1 撮影時点における前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得して、前記細胞の前記 1

次情報の統計指標値を計算し、

前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システム。

[請求項29]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、

前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得して前記第1撮影時点および前記第2撮影時点のそれぞれにおける前記1次情報の統計指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値から経時変化指標値を計算し、

前記処理装置は、前記経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システム。

[請求項30]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第 1 撮影時点および前記第 1 撮影時点以降の第 2 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、

前記処理装置は、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点の前記 1 次情報から経時変化指標値を計算し、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点のそれぞれにおける前記経時変化指標値の統計指標値を計算し、

前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システム。

[請求項31]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第 1 撮影時点および前記第 1 撮影時点以降の第 2 撮影時点および前記第 2 撮影時点以降の第 3 撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、

前記処理装置は、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の 1 次情報を取得し、前記第 1 撮影時点および前記第 2 撮影時点および第 3 撮影時点のそれぞれにおける前記 1 次情報の統計

指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、

前記処理装置は、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点を前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システム。

[請求項32]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次経時変化指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点およ

び第3撮影時点のそれぞれにおける前記2次経時変化指標値の統計指標値を計算し、

前記処理装置は、前記統計指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点の前記継代タイミングに到達した時点であるとの判定を行う継代タイミング判定システム。

[請求項33]

培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の継代タイミングを判定する継代タイミング判定システムであって、

前記培養容器の前記培地の所定の複数の地点の各地点の培養面の細胞を撮影して細胞画像として取得する撮像手段と、

前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得する処理装置と、を備え、

前記撮像手段は、第1撮影時点および前記第1撮影時点以降の第2撮影時点および前記第2撮影時点以降の第3撮影時点において、前記培養容器の所定の複数の地点における細胞を撮影して、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記所定の複数の地点の各地点の細胞画像として取得し、

前記処理装置は、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記各地点の前記細胞画像に撮影されている細胞の1次情報を取得し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記1次情報の1次経時変化指標値と、を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点および第3撮影時点のそれぞれにおける前記1次経時変化指標値の統計指標値を計算し、前記第1撮影時点および前記第2撮影時点の前記統計指標値と、前記第2撮影時点および前記第3撮影時点の前記統計指標値と、から2次経時変化指標値を計算し、

前記処理装置は、前記2次経時変化指標値が所定の閾値に達した時点に対応する撮影時点の前記継代タイミングに到達した時点であると

の判定を行う継代タイミング判定システム。

- [請求項34] 請求項29に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記経時変化指標値は、前記統計指標値の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度または所定倍加時間である継代タイミング判定システム。
- [請求項35] 請求項31に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記1次経時変化指標値は、前記統計指標値の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度または所定倍加時間である継代タイミング判定システム。
- [請求項36] 請求項30に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記経時変化指標値は、前記1次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度または所定倍加時間である継代タイミング判定システム。
- [請求項37] 請求項32に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記1次経時変化指標値は、前記1次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度または所定倍加時間である継代タイミング判定システム。
- [請求項38] 請求項33に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記1次経時変化指標値は、前記1次情報の、差分変化量、変化量率、単位時間変化率、変化速度、変化時間、比増殖速度または所定倍加時間である継代タイミング判定システム。
- [請求項39] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記1次情報は、前記細胞画像の中の、細胞数、細胞密度、細胞の専有面積、細胞の単体面積、細胞間の相対距離のいずれかである継代タイミング判定システム。
- [請求項40] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、

- 前記統計指標値は、平均値である継代タイミング判定システム。
- [請求項41] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記統計指標値は、総和である継代タイミング判定システム。
- [請求項42] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記統計指標値は、分散または偏差である継代タイミング判定システム。
- [請求項43] 請求項29から33のいずれか一項に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、細胞の伸展または増殖が現れなくなる統計指標値として画定される継代タイミング判定システム。
- [請求項44] 請求項42に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記分散または前記偏差の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定システム。
- [請求項45] 請求項34に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
- 前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経時変化指標値として画定される継代タイミング判定システム。
- [請求項46] 請求項34に記載の継代タイミング判定システムであって、
- 前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、
- 前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、前記経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定システム。

- [請求項47] 請求項35に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記2次経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経
時変化指標値として画定される継代タイミング判定システム。
- [請求項48] 請求項35に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算
され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記2次経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タ
イミング判定システム。
- [請求項49] 請求項36または37に記載の継代タイミング判定システムであっ
て、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記統計指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経時変化指
標値として画定される継代タイミング判定システム。
- [請求項50] 請求項36または37に記載の継代タイミング判定システムであっ
て、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算
され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記統計指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング
判定システム。
- [請求項51] 請求項38に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記変化量率は任意の一の撮影時点における値として計算され、
前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記2次経時変化指標値の増加傾向が見られなくなった時点の2次経

時変化指標値として画定される継代タイミング判定システム。

[請求項52] 請求項38に記載の継代タイミング判定システムであって、
前記変化量率は直前の撮影時点における値に対する割合として計算され、

前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
前記2次経時変化指標値の時間変化の変曲点として画定される継代タイミング判定システム。

[請求項53] 請求項31から33のいずれか一項に記載の継代タイミング判定システムであって、

前記第1撮影時点と前記第2撮影時点との時間間隔と、前記第2撮影時点と前記第3撮影時点との時間間隔とは、同じ時間間隔である継代タイミング判定システム。

[請求項54] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、

前記所定の閾値は、予め事前の検定を実施し、その検定において、
機械学習により画定される継代タイミング判定システム。

[請求項55] 請求項28から33のいずれか1項に記載の継代タイミング判定システムであって、

前記処理装置は、前記撮像手段と通信可能に、前記撮像手段と離れて配置されている継代タイミング判定システム。

[請求項56] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養システムであって、

請求項28に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。

[請求項57] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養シス

テムであって、

請求項 29 に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。

[請求項58] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養システムであって、

請求項 30 に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。

[請求項59] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養システムであって、

請求項 31 に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。

[請求項60] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養システムであって、

請求項 32 に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。

[請求項61] 培養容器の中の培地の中で伸展または増殖する細胞の細胞培養シス

テムであって、

請求項 33 に記載の継代タイミング判定システムと、

前記培養容器の培地を交換する培地ユニットと、前記培養容器を所定の温度で保管する培養ユニットと、前記培養容器を前記継代タイミング判定システムと前記培養ユニットとの間で移送する移送ユニットとの少なくとも一つを有する細胞培養システム。