

令和元年6月17日現在

機関番号：33401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00261

研究課題名(和文) 生体組織画像における高精度な細胞領域セグメンテーション手法の開発

研究課題名(英文) Development of high-accuracy cell segmentation for living tissue imaging

研究代表者

木森 義隆 (Kimori, Yoshitaka)

福井工業大学・環境情報学部・准教授

研究者番号：10585277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、定量化を志向した生命科学研究の技術基盤の構築を目的として、汎用性・頑健性を持つ、高精度な細胞領域の自動セグメンテーション手法の開発を実施した。

本研究では、(1)細胞輪郭領域の初期セグメンテーション手法の開発、(2)ノイズやアーチファクトの除去手法の開発、(3)不連続な輪郭の連結手法の開発、(4)輪郭に近接した構造体の除去手法の開発、(5)開発手法に基づく細胞の形態解析の実施、の5つの研究課題に取り組んだ。本手法による細胞セグメンテーション結果を目視による細胞認識結果と比較したところ、正答率は98%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物医学画像における解析領域のセグメンテーション(背景からその領域を切り出すこと)は、対象の特徴を定量化するために必須の処理である。また、生命科学研究分野においては、多種・大量の画像データを取り扱う必要があることから、その処理の自動化が求められている。しかし、生物医学画像の取り扱いの困難さから、いまだ、精度の高いセグメンテーション手法は確立していなかった。そこで、生物医学画像の性質を十分に考慮し、その対応に特化した、rotational morphological processingに基づく独自の画像処理手法を構築し、高い精度をもつ自動セグメンテーション手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish a technical basis for quantitative life science research, a highly accurate, versatile, and robust automatic cell region segmentation method has been developed. Five research subjects were considered: (1) an initial method to divide the cell contour region; (2) a method to remove noise and artifacts; (3) a method to combine discontinuous contours; (4) a method to remove the structure close to contour; and (5) implementation of a morphological analysis of cells based on the developed methods. The comparison of cell segmentation result and cell recognition result obtained using the proposed method and visual observation, respectively, revealed that the proposed method realized 98% accuracy.

研究分野：画像情報学

キーワード：Mathematical morphology セグメンテーション 形態情報解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のバイオイメージング手法の発展に伴い、生命現象の多くは、画像として記録されている。今後の生命科学研究分野においては、画像データに基づき、解析対象の定量化や数理モデルの構築、さらにはコンピュータ・シミュレーションを実施する機会がより増えてくると考えられる。その際、重要になるのは、画像データを適切に処理し、有用な情報を抽出する手法を確立することである。これまでは、主として、マニュアル操作による情報抽出が行われてきたが、客観性や再現性の観点から見ると問題があることは言うまでもない。また、大容量のデータ処理や目視では識別できないような微細な構造の記述など、人手では対応が困難な処理も多く存在する。そこで、計算機による自動的な画像処理手法の実現が望まれているところである。

研究代表者は、これまでの研究として、生物医学画像を対象として、mathematical morphology に基づく新規の画像処理手法を開発してきた。Mathematical morphology は、集合論を基盤とし、様々な処理を一貫した論理で表現し、実行しうる数理体系である。これまでの研究では、従来の理論を拡張した独自の画像処理演算(Rotational Morphological Processing, 以降 RMP)を用い、生物医学画像処理に適合した形態情報抽出フィルタを設計した(Kimori et al., *BMC Bioinformatics*, 2010; Kimori, *J. Clin. Bioinforma.*, 2011)。これによって、大きさ、濃淡値において、目視では検出困難な解析対象領域の抽出を実現する要素技術を確立した。また、最近では、本画像処理手法に基づき、植物細胞(シロイヌナズナの根毛細胞)における細胞骨格の形態解析手法を開発した(Kimori et al., *J. Theor. Boil.*, 2016)。これにより、観察者が言語化できない多様な表現型や微細な構造変化を定量的に記述することができるようになった。

現在の生命科学研究における共通の課題のひとつは、組織中の細胞の個数や面積等の形態特徴の計測、あるいは、経時的な組織・細胞の形状変化の計測等という、対象の形態情報の定量化である。そして、それを実現するための画像処理的な課題として、対象領域の自動セグメンテーション手法を確立することが求められている。これまで、多くのセグメンテーション手法が提案されてきた。しかし、いずれの方法も生物画像に特有のノイズの影響や不明瞭な境界、さらには輪郭形状の多様性等に十分に対応できないため、抽出精度が低いという深刻な問題があった。したがって、これらの既存の手法を用いて、上記の研究課題を解決することは困難であり、現状では、「セグメンテーション」は「定量化」に対するボトルネックとなっていた。

この問題を解決するためには、生物画像の性質を十分に考慮し、その対応に特化した画像処理手法を用いた高精度のセグメンテーション手法の開発が必要であった。

2. 研究の目的

生命科学研究におけるセグメンテーションの問題を解決するための画像処理には、ノイズやボケ、コントラストの高低に関わらず、対象領域を特異的に強調すること、生物試料に特有な多様な形態に対処し、その構造を保存したり、除去したりできること、という条件が求められる。本研究代表者が開発した RMP を用いれば、これらの条件を満たす画像処理手法を構築することが可能であった。そこで、本研究では、定量化を志向した生命科学研究の技術基盤の構築をめざし、RMP の数理理論に基づく画像処理手法を駆使し、汎用性・頑健性を持つ、高精度な細胞領域の自動セグメンテーション手法を開発することを目的とした。解析対象は、各種顕微鏡で撮影された生体組織中の細胞とし、その領域の内外を分かち輪郭部位の高精度な自動抽出手法の開発を実施した。

3. 研究の方法

本研究は、RMP に基づく形態情報の抽出手法を用いた、高精度な細胞領域のセグメンテーション手法を開発するものであった。研究期間内での研究課題を次の 5 項目に分けた。

- (1) 細胞輪郭領域の初期セグメンテーション手法の開発
- (2) ノイズやアーチファクトの除去手法の開発
- (3) 不連続な輪郭の連結手法の開発
- (4) 輪郭に近接した構造体の除去手法の開発
- (5) 開発手法に基づく細胞の形態解析の実施

項目 1 では、細胞輪郭の初期セグメンテーションとして、RMP に基づく形態特徴強調フィルタを用い、輪郭領域を強調し、自動閾値法により自動抽出する手法を開発した。この際、細胞輪郭の幅や凹凸など、形状の正確な抽出を実現することに注力した。その後、輪郭領域を強調し、2 値化する手法を開発した。また、ノイズやアーチファクトを低減するため特別な処置も必要であった。このために RMP に基づく平滑化、領域分割手法などを組み合わせた多段階処理のアルゴリズムを設計し、より頑健性、汎用性がある手法を開発した。ただ、このような画像処理を実行しても、2 値化後の結果として、輪郭領域以外に、ノイズを含む様々な構造が抽出された。

そこで、項目 2 で、これらを除去する手法を開発した。輪郭の微細構造を保持したノイズ除去フィルタの適用や面積に応じたクラスタリングを行い、サイズ分布に基づいた微小構造体の除去手法を開発した。ただ、輪郭は必ずしも閉じた状態で抽出されるとは限らない。このため、項目 3 では、途切れた部位を連結する手法を開発した。細胞領域を閉じた線で表現するため、不連続部位の連結手法の開発を行った。Mathematical morphology には、closing と呼ばれる演算があり、このような断裂した領域の結合に用いられる。しかし、単にこの処理を適用しただけでは、不連続部位の連結と同時に、輪郭の狭隘部位も結合するという問題が生じた。そこで、まず、不連続部位の端点を検出し、その部位にのみ、

RMP closing を適用し、連結する手法を開発した。しかし、それでもなお画像によっては、輪郭の途切れが生じる場合もあった。そこで、それを閉合することが可能な region growing 法も開発した。

項目 4 では、抽出した輪郭に近接した細胞内構造体を除去する手法を開発した。Mathematical morphology による形態識別手法を用いて、細胞の領域とそれ以外の構造体の形態の違いに基づく領域分類手法を開発した。項目 5 では、本手法を様々な画像データに適用し、精度や汎用性・頑健性を高めるとともに、医療応用に向けた細胞の形態解析を試みた。平成 28 年度は、項目 1, 2, 平成 29 年度は、項目 3, 4 を、そして、平成 30 年度で項目 5 を実施した。

4. 研究成果

本研究で開発したセグメンテーション手法の生体組織画像への適用事例を図 1 に示す。図 1a は、ショウジョウバエ腹側神経索の ssTEM (serial section Transmission Electron Microscopy) 像であり、ここでは、これを原画像とする (<https://github.com/unidesigner/groundtruth-drosophila-vnc> より取得。Segmented anisotropic ssTEM dataset of neural tissue. Stephan Gerhard, Jan Funke, Julien Martel, Albert Cardona, Richard Fetter. figshare. Retrieved 16:09, Nov 20, 2013.)。まず、この画像に、ノイズやアーチファクト等の低減を目的として、RMP に基づく平滑化手法 (RMP opening と RMP closing を組み合わせ、異なるサイ

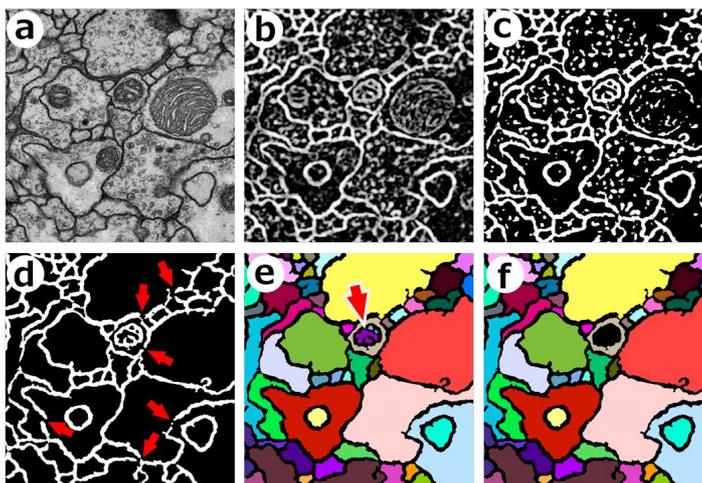


図 1 ssTEM 像に対する開発手法の適用結果。(a)原画像、(b)細胞輪郭の強調、(c)2 値化、(d)ノイズ、アーチファクトの除去(輪郭の不連続箇所を矢印で示す)、(e)細胞領域の膨張(除去すべき細胞内構造体を矢印で示す)、(f)細胞領域のセグメンテーション結果。

ズの複数の構造要素を用いた多段階のフィルタ)を適用し、その後、RMP に基づく top-hat 変換を実施した。結果を図 1b に示す。強調処理における構造要素のサイズなどの値は、細胞膜の強調がより効果的になるよう調整した。この強調画像に自動閾値法を適用し、2 値化したものが、図 1c である。この 2 値化結果を見ると、細胞の輪郭以外にも様々な構造体が抽出されていることがわかる。このため、ノイズ等を除去しつつも、輪郭の微細構造を保存できるような、より高精度な輪郭領域の抽出手法を試みた。本手法の基礎としたのが、mathematical morphology による、connected filter である。これは、通常、濃淡画像に対し、その輝度レベルにおいて空間的に連結した領域ごとに分割した connected component を生成し、その属性によって、画像中の領域選択を実施するものである。本開発では、2 値化画像に connected operator の一種である area opening を適用し、2 値化画像を構成する各領域の面積の属性によって、細胞の輪郭領域とそれ以外の領域に区分し、輪郭領域のみの選択を行った。これによって、細胞輪郭形状を変化させることなく、ノイズ等の不要な構造が除去できるようになった。その結果を図 1d に示す。

しかし、細胞の輪郭領域が途切れている部分が生じた(図 1d 中の該当領域のいくつかを矢印で示す)。この領域は、そもそも原画像において輪郭形状が不明瞭であったため、一定幅の領域として抽出できなかったり、また、2 値化画像で断片化した領域が除去されたりして生じる。この領域を閉合するため、不連続部位の端点を検出したあと、その部位にのみ、RMP closing を適用することによって、端点間を連結した。しかし、端点間の距離が大きい場合、RMP closing を適用できないという問題もあった。そこで、mathematical morphology に基づく region growing 法も開発した。これは、各輪郭内部の領域(図 1d の黒画素の領域)それぞれにひとつの“seed point”を与え、輪郭に達するまでその領域を膨張させていく方法である。ただし、seed point は一定の直径をもつ円形の構造要素により、同心円状に膨張させる。その際、細胞の輪郭領域の端点間の距離が構造要素の直径よりも小さい場合は、その不連続部位を超えて領域が膨張することはない。このため、細胞の内部から輪郭へ向かって空間的に連結した領域が生じ、その外周を細胞の輪郭とみなすことができる。その結果を図 1e に示す。各細胞の領域を異なる色(ラベル)で表している。本領域膨張手法により、細胞の輪郭が不連続な点があっても、比較的良好に細胞領域をセグメンテーションすることができるようになった。

最後に問題になるのが、細胞の領域内に存在する構造体の除去であった(本事例では、図 1e 中の矢印で示す構造体がそれに該当する)。ただ、この前段階までの処理により、画像内の領域のすべてがラベル化されているため、それぞれの領域の面積や輪郭形状に関する形態特徴を抽出することが可能である。そこで、領域の形態特徴に基づき細胞とそれ以外の構造体の分別を行い、実験的に閾値を設定し、構造体の除去を行った。最終的な結果を図 1f に示す。

さらに、本手法をマウスの心筋細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像に対して適用し、細胞領域のセグメンテーションを実施した。本手法の精度を評価するため、目視による細胞認識結果との比較実験を

実施した . 空間分解能 0.65 μ m/pixel の画像(512 \times 512 pixels) , 10 枚のデータセットの中から , 目視によって認識された細胞は 375 個であり , そのうち , 本手法は , 369 個の細胞を正しく認識できた . したがって本手法による細胞セグメンテーションの正答率は 98% であり , 高い自動認識結果を示した . 本手法の詳細と解析結果は論文としてまとめており , 現在 , 投稿準備中である .

研究期間全体を通じ , 手法開発に関する研究計画はほぼ予定通りに遂行することができた . 今後は , より多くの組織画像に本手法を適用し , その効果を定量的に計測することにより , 機能の改良や拡充を試みたい .

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Shichino Y., Otsubo Y., Kimori Y., Yamamoto M., Yamashita A., YTH-RNA-binding Protein Prevents Deleterious Expression of Meiotic Proteins by Tethering Their mRNAs to Nuclear Foci., *Elife* (2018) e32155. doi:10.7554/eLife.32155.
- (2) Takeuchi H., Horie S., Moritoh S., Matsushima H., Hori T., Kimori Y., Kitano K., Tsubo Y., Tachibana M., Koike C., Different Activity Patterns in Retinal Ganglion Cells of TRPM1 and mGluR6 Knockout Mice., *Biomed. Res. Int.* (2018) 2018:2963232. doi: 10.1155/2018/2963232.
- (3) Ueda H., Ohta N., Kimori Y., Uchida T., Shimada T., Tamura K., Hara-Nishimura I., Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Proteins (LUNAPARKs) are Required for Proper Configuration of the Cortical ER Network in Plant Cells. *Plant Cell Physiol.* (2018), 59, 1931-1941. doi:10.1093/pcp/pcy137.
- (4) Aoyagi Y., Hibi T., Kimori Y., Sawada M., Kawakami R., Sawamoto K., Nemoto T. Heterogeneous Distribution of Doublecortin-Expressing Cells Surrounding The Rostral Migratory Stream in The Juvenile Mouse. *J. Comp. Neurol.* (2018) 526, 2631-2646. doi: 10.1002/cne.24521.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 木森義隆 , Mathematical morphology に基づく生物形態情報の抽出と数値化 , バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2016 , 2016 年 6 月 22 日 ~ 2016 年 6 月 23 日 , 大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市)
- (2) 木森義隆 , 生命科学分野における画像情報処理と ABiS 画像解析支援 , ファイブスターアソシエーション・ダイナミックアライアンス・ニコイメーキングセンター 公開シンポジウム - 多様な生命機能の可視化解析と操作技術の展開 , 2016 年 12 月 1 日 , 北海道大学工学部 (北海道札幌市)
- (3) 木森義隆 , Mathematical morphology による生物形態特徴の数値化 , 定量生物学の会 第 8 回年会 , 2017 年 1 月 8 日 ~ 2017 年 1 月 9 日 , 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- (4) 木森義隆 , 画像理解のための情報抽出および特徴記述手法に関する検討 , 情報アクセシビリティをめぐる諸問題に関する研究集会 , 2017 年 2 月 10 日 ~ 2017 年 2 月 11 日 , 福岡システム LSI 総合開発センター (福岡県福岡市)
- (5) 木森義隆 , 生物顕微鏡画像における形態情報の抽出とその数量的表現 , 日本植物学会第 82 回大会 , 2018 年 9 月 14 日 ~ 2018 年 9 月 16 日 , 広島国際会議場 (広島県広島市)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。