

平成30年6月12日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12526

研究課題名(和文) 深層学習を用いた非侵襲細胞分化判別

研究課題名(英文) Noninvasive cell differentiation discrimination using depth learning

研究代表者

新岡 宏彦 (Hirohiko, Niioka)

大阪大学・データリティフロンティア機構・特任准教授(常勤)

研究者番号：70552074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：深層学習を用いて、培養細胞の分化や細胞種を蛍光分子等使わず非侵襲に判断することの出来る技術の構築を行った。C2C12細胞(マウス筋芽細胞)の分化誘導を開始した日をDay0とし、CNN(Convolutional Neural Network)にDay0、Day3、Day6の位相差画像データを分類させたところ91.8%の正答率を達成した。また、DNN(Deep Neural Network)により3種類の生体組織由来のラマンスペクトルデータを86.2%の精度で分類することに成功した。さらに、アンチストークスラマン散乱(CARS)を用いることでデータ取得速度を大幅に向上させた。

研究成果の概要(英文)：We have constructed a technique that judge the differentiation of cells and cell types noninvasively without using fluorescent molecules etc. by using depth learning. The date when differentiation of C2C12 (myoblast) starts is defined as Day 0. The phase contrast microscopy image data of Day 0, Day 3, Day 6 was classified with CNN (Convolutional Neural Network), and the accuracy of 91.8% was achieved. In addition, DNN (Deep Neural Network) succeeded in classifying Raman spectral data derived from three kinds of biological tissues with an accuracy of 86.2%. Furthermore, by using anti-Stokes Raman scattering (CARS), data acquisition time was greatly improved.

研究分野：深層学習

キーワード：深層学習 ディープラーニング 人工知能 再生医療 細胞分化 顕微鏡 内視鏡 ラマン分光

### 1. 研究開始当初の背景

iPS細胞やES細胞を用いることで、怪我や病気で冒された組織や臓器を元通りの形にし、その機能を再生する再生医療技術が現実味を帯びてきた。その実現のためには、様々な問題があるが、産業的な観点から述べれば如何にその費用を抑え、如何に低い価格で提供するかが鍵になるだろう。組織や臓器作製の自動化・機械化は、人件費を抑制し、低価格化を実現する技術の1例といえる。既に細胞の自動培養装置等は販売されており、次に必要なのは、培養された細胞の分化や、細胞種を自動的かつ非(低)侵襲的にチェックすることのできる技術である。人の臓器を作製するためには大量の細胞の培養が必要であり、各細胞の分化を人がチェックしては人件費が膨大になる。また、細胞の分化は蛍光色素による分化マーカーの染色や、遺伝子発現解析によって行なわれるが、どちらも侵襲的であるために再生医療には不向きである。従って、位相差顕微鏡観察による画像計測や、ラマン散乱顕微鏡を用いたスペクトル計測や画像計測など、非(低)侵襲な計測法を用いる必要がある。

### 2. 研究の目的

上記のような背景において、深層学習による画像やデータ解析技術を応用し、細胞の分化状態を判別する技術を確認することが本研究の目的である。本研究では、深層学習を用いた手法により、細胞の位相差画像や、ラマンスペクトル解析による非侵襲細胞分化判定システムを構築する。

### 3. 研究の方法

位相差顕微鏡およびラマン顕微鏡を用いてデータ取得を行う。位相差顕微鏡で取得した細胞画像を分類する際は、深層学習の中でも画像分類タスクに優れていると言われる CNN (Convolutional Neural Network) を用い、分類の正答率で評価を行った。また、ラマンスペクトル解析においては、DNN (Deep Neural Network) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) CNNによるC2C12細胞の分化の判別

細胞として、C2C12(マウス筋芽細胞)を用いた。コンフルエントになるまで培養した後、培地を無血清培地へ交換することにより、筋芽細胞から筋管細胞への分化が始まる。筋芽細胞はやや丸みを帯びた形状をしているが、細胞同士が融合し多核で繊維状の筋管細胞へと分化する(図1(a))。培地交換日をDay 0、培養3日後をDay 3、6日後をDay 6とし、それぞれの細胞を位相差顕微鏡で観察すると、図1(b)に示すような細胞の形状変化がはっきりと観察された。また、分化マーカーとしてミオシン重鎖を免疫染色し、蛍光顕微鏡により観察したところ、Day 6の試料でミオシン重鎖の発現を確認した。

Tensorflow frameworkとKerasを用いて図2に示すようなCNNを構築した。特徴抽出を行う構造として畳み込み層が2層、マックスプーリングを行うプーリング層が2層、その後識別を目的として3層の全結合層で構成されている。最終層のノード数は3であり、Day 0からDay 6の3種類の細胞画像を分類する。学習に用いた活性化関数はReLU関数であり、出力の活性化関数のみsoftmax関数を用いた。

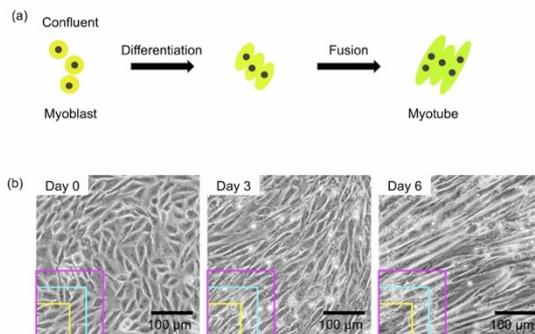


図1 (a) C2C12の細胞分化による細胞形状の変化 (b) C2C12の位相差顕微鏡像

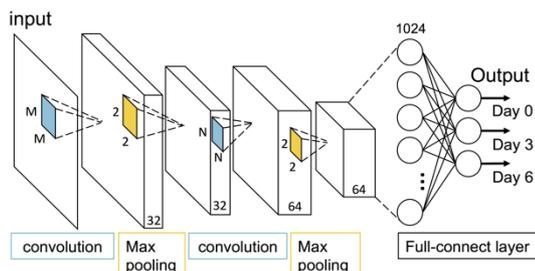


図2 用いたCNNの構造

Day0, Day3, Day6のC2C12細胞画像について、それぞれ200x200 pixel、300x300 pixel、400x400 pixelのサイズで各1400枚ずつ用意した。それぞれの画像サイズは図1(b)中の四角で表され、黄色は200x200 pixel、水色は300x300 pixel、紫色は400x400 pixelに対応する。また、図2に示されるconvolution時のkernelサイズMとNをそれぞれM=3, 5, 7, N=3, 6, 10となるよう全9通りのCNNを用意した。さらに、分類の正答率を出力する際には1400枚のデータを10対1に分けて10回の交差検証を行なった。結果、kernelの組み合わせがM=3, N=10の時にどのサイズの画像でも最も正答率が高く、200x200 pixelから順に73.9%, 78.1%, 82.4%であった。画像サイズを大きくすることで正答率が上昇した。これは、200x200 pixelの画像では、細胞が画像からはみ出してしまい、うまく特徴を抽出できなかったと考える。さらに、1400枚の画像データに対して、画像の回転や反転によってデータ数を8倍の11200枚に水増しして同様の学習を行ったところ、

正答率は 400x400 pixel の画像サイズを使用した時に 91.8 %まで上昇した(表 1)。

Image size	Number of data	Accuracy
200x200	11200	84.9%
300x300	11200	89.4%
400x400	11200	91.8%

表 1 データ水増し後の正答率

次に、Day 0, Day 3, Day 6 の比較的大きい細胞画像(4080x3072pixel)を用いて、画像内の各領域(200x200 pixel)の細胞を CNN により識別し、Day 0 と認識すれば青色、Day 3 あるいは Day 6 と認識すればそれぞれ緑色、赤色というように色分けした(図 3)。分化度の違いを色で視覚的に表現できたと言える(論文業績 3)。

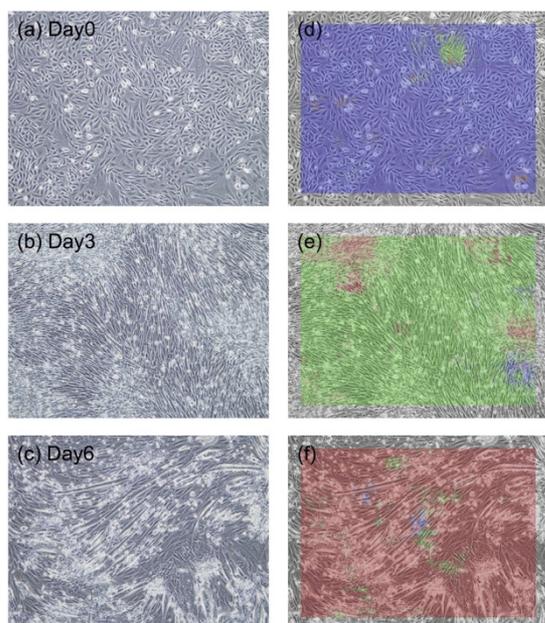


図 3 (a)Day 0, (b)Day 3, (c)Day 6 の位相差顕微鏡像、(d)-(f)CNN の分類結果に従いカラー化した画像

### (2)DNN によるラマンスペクトルの分類

抹消神経、骨格筋、結合組織の 3 種の細胞組織由来のラマンスペクトルデータを用い、DNN(Deep Neural Network) により分類を行った。それぞれの組織に由来するラマンスペクトルデータを 86.2%程度の精度で分類可能であった。ラマンスペクトルと深層学習により細胞組織の種類を分類することに成功した。

### (3)CARS 内視鏡の構築とラット坐骨神経のイメージング

ラマン散乱の信号は微弱であり、データ取得

に時間がかかる欠点がある。近年、ラマン顕微鏡による細胞の画像取得速度は向上しているが、1 画像あたり数分程度は必要である。従って、CNN で学習するために大量の画像を得ようとする大変時間がかかってしまう。本研究ではラマン顕微鏡だけでなく、さらに、非線形ラマン散乱過程の一つである CARS (Coherent Antistokes Raman Scattering) を用いることでデータ取得の短時間化を行った。また、術中診断に応用することを想定し、CARS 内視鏡を作製した。図 4 はラット坐骨神経の (a) 顕微鏡像(低倍率)、(b) 透過像、(c) CARS 内視鏡像である。神経細胞が持つミエリン鞘は脂質を多く含み、 $\text{CH}_2$  に由来する  $2845 \text{ cm}^{-1}$  の信号が強いため、CARS 内視鏡で同定することに成功した。1 枚の画像取得にかかった時間は 2 秒である(論文業績 1)。

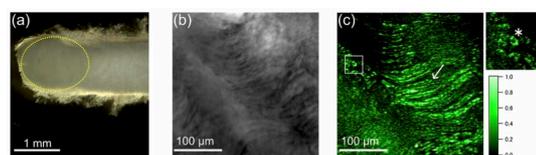


図 4 ラット坐骨神経の (a) 顕微鏡像(低倍率)、(b) 透過像、(c) CARS 内視鏡像。ミエリンの繊維状の構造(矢印)と円形の構造(アスタリスク)が良く観察されている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① K. Hirose, T. Aoki, T. Furukawa, S. Fukushima, H. Niioka, S. Deguchi, and M. Hashimoto, “Coherent anti-Stokes Raman scattering rigid endoscope for robot-assisted surgery”, Biomedical Optics Express, 9, 2, 387-396 (2018)
- ② J. Miyake, Y. Kaneshita, S. Asatani, S. Tagawa, H. Niioka, T. Hirano, “Graphical classification of DNA sequences of HLA alleles by Deep learning”, Human cell, 31, 2, 102-105 (2018)
- ③ H. Niioka, S. Asatani, A. Yoshimura, H. Ohigashi, S. Tagawa, and J. Miyake, “Classification of C2C12 cells before and after differentiation with convolutional neural network and phase contrast images”, Human cell, 31, 1, 87-93 (2018)
- ④ T. Minamikawa, Y. Murakami, N. Matsumura, H. Niioka, S. Fukushima, T. Araki, and M. Hashimoto,

“Photo-induced cell damage analysis for single- and multi-focus coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy”, Journal of Spectroscopy, Vol. 2017, Article ID 5725340, 8 pages (2017)

[学会発表] (計 15 件)

① ○H. Niioka

“Technologies of Deep Learning for Medical Applications”  
The 9th MEI<sup>3</sup> Center International Symposium -AI Medicine: Revolution- (Icho Kaikan 3F Hall, Osaka University, Osaka, Japan, 2018/3/13, Invited)

② ○新岡宏彦

“生体イメージングデータに対する深層学習の応用”  
平成 29 年度統計数理研究所共同研究集会 生体信号・イメージングデータ解析に基づくダイナミカルバイオインフォマティクスの展開 (統計数理研究所, 東京都, 2017/10/26, 招待講演)

③ ○新岡宏彦, 田川聖一, 三宅淳

“ディープラーニングをバイオメディカルに如何に使うか”  
CBI 学会 2017 年大会 データ駆動型研究が拓く創薬 (タワーホール船堀, 東京都, 2017/10/4, 招待講演)

④ ○新岡宏彦, 柳本舎那, 浅谷学嗣, 田川聖一, 梶村春彦, 三宅淳,

“人工知能を用いた胃癌の病理画像診断 (Artificial intelligence and image analysis in pathological gastric cancer diagnosis)”  
第 106 回 日本病理学会総会 (2017/04/27-29, 京王プラザホテル, 東京) (ポスター)

⑤ 三宅淳, 浅谷学嗣, 吉村愛菜, 大東寛典, 田川聖一, ○新岡宏彦

“人工知能・ディープラーニングと位相差顕微鏡像による細胞分化識別 (Recognition of differentiation and canceration of cells by phase-contrast images and deep learning)”  
第 106 回 日本病理学会総会 (2017/04/27-29, 京王プラザホテル, 東京)

⑥ 田川聖一, 三宅淳

“深層学習による生体情報分類”  
日本生体医工学会生体 医用画像研究会第 4 回若手発表会シンポジウム「生体医用画像の潮流 III」(2017/3/25, 豊中キャンパスシグマホール, 招待講演)

⑦ ○新岡宏彦

“ディープラーニングによるバイオデータ解析 (Deep learning for biological data analysis)”  
大阪大学医学系研究科フォーラム 第 8 回若手研究フォーラム (大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館 3F 阪急電鉄・三和銀行ホール, 2017/2/27, 招待講演)

⑧ ○新岡宏彦

“医療画像の解析と応用 (幹細胞、ガン細胞、X線画像、MRI 等)”  
産学連携・クロスイノベーションイニシアチブ/未来医療交流会/最先端医療イノベーションセンター合同セミナー「AI・ディープラーニング等の現状と医学領域への応用可能性」(2016/12/6, 大阪大学医学部講義棟 1 階 A 講堂, 招待講演)

⑨ ○田川聖一

“情報工学と AI の医療応用”  
産学連携・クロスイノベーションイニシアチブ/未来医療交流会/最先端医療イノベーションセンター合同セミナー「AI・ディープラーニング等の現状と医学領域への応用可能性」(2016/12/6, 大阪大学医学部講義棟 1 階 A 講堂, 招待講演)

⑩ ○新岡宏彦, 浅谷学嗣, 吉村愛菜, 大東寛典, 田川聖一, 三宅淳

“ディープラーニングと位相差顕微鏡像による自動的 C2C12 細胞分化識別”  
第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜) (ポスター)

⑪ ○新岡宏彦, 浅谷学嗣, 大東寛典, 田川聖一, 三宅淳

“深層学習と位相差顕微鏡像を用いて C2C12 細胞の分化を可視化する”  
SSSEM 研究部会&生理研研究会 合同ワークショップ「電子顕微鏡ビッグデータが拓くバイオメディカルサイエンス」～電子顕微鏡による生物構造情報の抽出～ (2016/11/18-19, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県) (ポスター)

⑫ ○新岡宏彦, 浅谷学嗣, 大東寛典, 田川聖一, 三宅淳

“畳み込みニューラルネットワークによる C2C12 細胞の分化度の識別”  
第 68 回 日本生物工学会大会 (2016/9/28-30, 富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山) (ポスター)

⑬ ○新岡宏彦, 浅谷学嗣, 吉村愛菜, 大東寛典, 田川聖一, 三宅淳

“畳み込みニューラルネットワークを用いて C2C12 細胞の分化を可視化する (Visualization of C2C12 cellular

differentiation with using convolutional neural network)”

第10回バイオ関連化学シンポジウム (2016/9/7-9, (1)石川県立音楽堂、(2)もてなしドーム地下イベント広場, 金沢) (ポスター)

⑭ ○大東寛典, 浅谷学嗣, 田川聖一, 新岡宏彦, 三宅淳

“位相差顕微鏡像と畳み込みニューラルネットワークを用いた C2C12 細胞の分化識別 (Recognition of differentiation of C2C12 cells by using phase-contrast images and convolutional neural network)”

第25回日本バイオイメージング学会学術集会 (2016/9/4-6, 名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール) (ポスター)

⑮ ○新岡宏彦, 浅谷学嗣, 大東寛典, 田川聖一, 三宅淳

“Convolutional Neural Network による C2C12 細胞の分化判別”

バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2016 (2016/6/22-23, 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館) (ポスター)

#### [図書]

① 三宅淳, 田川聖一, 新岡宏彦

人工知能 Deep Learning の医学応用,

CMC 出版, AI 導入によるバイオテクノロジーの発展(植田克美編)/第4章 3, 119-126 (2018)

② 新岡宏彦, 山本修也, 大東寛典, 浅谷学嗣, 三宅淳

人工知能の医療画像解析への応用,

CMC 出版, AI 導入によるバイオテクノロジーの発展(植田克美編)/第4章 4, 127-131 (2018)

③ 三宅淳, 田川聖一, 新岡宏彦

“人工知能 Deep Learning の医学応用”

医用画像情報学会誌 Vol. 34, No. 3, 120-125 (2017)

④ 三宅淳, 山本修也, 島林真人, 田川聖一, 新岡宏彦

“ディープラーニングのバイオテクノロジーへの応用可能性”

公益財団法人 日本化学会 バイオテクノロジー部会 NEWS LETTER Vol. 21, No. 1, pp. 3-8 (2017)

⑤ 新岡宏彦, 山本修也, 大東寛典, 浅谷学嗣, 三宅淳

“ディープラーニングのバイオへの応用”

月刊機能材料 36(10), pp. 61-67 (2016)

⑥ 田川聖一, 浅谷学嗣, 三宅淳

“確率とディープラーニング”

月刊機能材料 36(9), pp. 53-60 (2016)

⑦ 佐久間洋司, 浅谷学嗣, 田川聖一, 三宅淳

“実世界に向けた深層学習の取り組み”

月刊機能材料 36(8), pp. 52-58 (2016)

⑧ 浅谷学嗣, 田川聖一, 三宅淳

“画像認識に応用されるディープラーニング”

月刊機能材料 36(7), pp. 40-48 (2016)

⑨ 金下裕平, 浅谷学嗣, 田川聖一, 三宅淳

“ディープラーニングの技術概要”

月刊機能材料 36(6), pp. 61-67 (2016)

[その他]

ホームページ等

大阪大学データビリティフロンティア機構

<http://www.ids.osaka-u.ac.jp>

研究代表者の researchmap

[https://researchmap.jp/Hirohiko\\_Niioka/](https://researchmap.jp/Hirohiko_Niioka/)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

新岡 宏彦 (NIIOKA HIROHIKO) 大阪大学・データビリティフロンティア機構・特任准教授 (常勤)

研究者番号 : 70552074

(2) 研究分担者

田川 聖一 (TAGAWA SEIICHI) 大阪大学・先導的学際研究機構・特任助教 (常勤)

研究者番号 : 60592764