

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16021

研究課題名(和文)4Dライブセルイメージングデータ内の非常に多数の細胞の自動追跡手法の開発

研究課題名(英文)Automatic tracking of multiple cell regions in 4D live-cell imaging data

研究代表者

広瀬 修 (Hirose, Osamu)

金沢大学・電子情報学系・助教

研究者番号：30549671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で4Dライブセルイメージングデータ内の非常に多数の細胞を自動追跡するための基盤技術の開発を目指した。細胞動画の典型的な特徴のひとつとして、多数の細胞が密に存在し視覚的に類似している。標準的な追跡手法を利用した場合、本来追跡すべき細胞を別の細胞と誤認し追跡に失敗する。この問題に対し、細胞の運動は近隣の細胞の位置や運動に依存するという空間的依存性に着目し、追跡のための補助的な情報としてこれを利用することで追跡精度の向上を目指した。課題研究を順調に遂行することができ、高速かつ高精度で細胞の追跡を行うことのできるソフトウェアの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed at developing the methods for automating the detection and tracking of cell regions in 4D live-cell imaging data. Cells in 4D live-cell imaging data are often imaged as ellipsoidal shapes and are densely distributed. For this data, standard methods usually fail to automatic tracking because of cell-switching and coalescence of tracked positions. To address this issue, we utilized typical characteristics in 4D live-cell imaging data; movements of nearby-located cells are strongly correlated. By using the characteristics used as the information for predicting cells' positions, we succeeded to improve tracking performance drastically. The software developed in this research is being distributed on the project website.

研究分野：人工知能

キーワード：物体追跡 粒子フィルタ マルコフ確率場 バイズ推定 人工知能 機械学習 4Dライブセルイメージングデータ

1. 研究開始当初の背景

近年、原子間力顕微鏡や電子顕微鏡などの視覚化技術と生体内蛍光観測技術が劇的に発展した。その結果、医学生物学分野においてこの観測技術が細胞レベルからタンパク質レベルの視覚化に至るまで活発に利用されている。それに伴い医学生物学分野で計算機による動画の解析が注目を浴びている。医学生物学において例えば病変部位の正常・異型細胞の数え上げや線虫の神経細胞の活性強度など画像情報からの定量化が必要とされるものの、このような作業は人的コストが非常に高く、自動化が避けられないことがその理由である。例えば、肝臓の超音波画像から肝臓の病変を自動検出・分類するための統計科学的な手法が開発されている(Jeon, 2013)。

このような流れの中で Smal らは伸展中の微小管の先端を計算機で追跡するための粒子フィルタを利用した手法を開発した(Smal, 2008)。粒子フィルタはもともと状態空間モデルと呼ばれる統計モデルに対する分布推定の手法で、その汎用性から人の顔や手の追跡など動画における様々な対象物の追跡に応用される。直感的には粒子フィルタは物体の運動モデルによる移動予測と、いわば計算機上での人海戦術的な場当たり探索を組み合わせた方法である。この意味で粒子フィルタの「粒子」とはいわば対象物を探索するための「人員」に対応し、各々の人員は物体の移動予測分に加え各自場当たりに移動する。探索の過程で、対象物が存在する可能性が低い場所から高い場所に人員を再配分することで、結果として多くの人員が残された場所が対象物の推定位置となる。Smal の研究は粒子フィルタに微小管の先端への他の物体の衝突回避を組み込んだ点で先駆的であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞動画からの密に存在する多数の対象物の同時追跡を課題とする。粒子フィルタは非常に強力な物体追跡の手法であるものの、ライブセルイメージングデータに対し多数の細胞の同時追跡を目的として標準的な粒子フィルタを応用した場合、以下の失敗が容易に起こる：

- (1) 本来追跡すべき細胞を近隣の別の細胞と誤認する。
- (2) 対象物の形状変化により追跡対象を見失う。

このような追跡ミスが問題となるのは細胞動画の次のような特徴に由来する：

- (a) 対象物の数が多く密に存在する。
- (b) 多数の対象物が視覚的に類似している。
- (c) 対象物の形状が経時的に変化する。

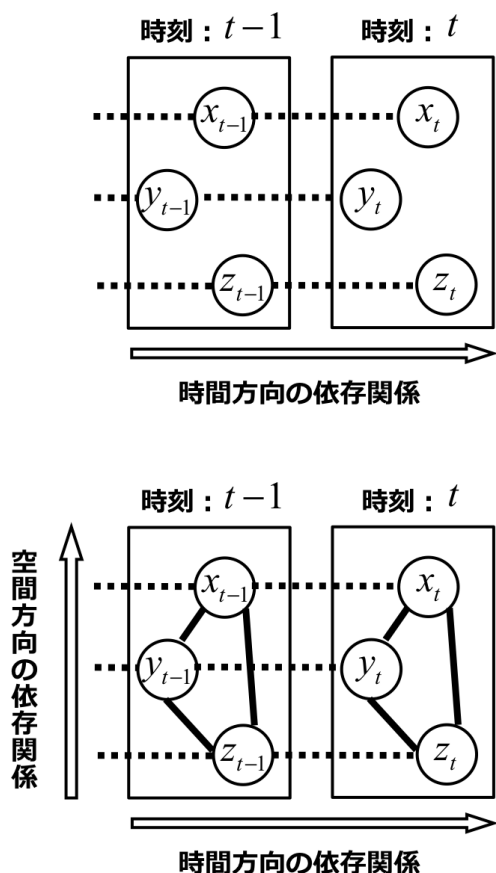
例えば、発生段階における蛍光された染色体に対するイメージングデータを考えると分かりやすい。細胞分裂が進めば進むほど細胞数が増加し密になる。また発生の初期段階ではすべての細胞で分裂が同期し存在する細胞はほぼ完全な複製であるため、短時間ではすべての細胞で視覚的な差異がない。しかしながら、分裂の過程で染色体の構造は劇的に変わりうる。この(a)(b)の特徴のため(1)の問題が起こる。また追跡対象が経時変化する特徴(c)のため、追跡対象を見失う問題(2)が起こる。そのため密に存在する多数の対象物の同時追跡が非常に困難となる。

本研究において、細胞動画から細胞などの非常に多数の対象物を同時追跡するための基盤技術の開発を目指す。具体的には、「マルコフ確率場」という統計モデルの枠組みで細胞運動の空間的依存性を設計し、粒子フィルタによる追跡手法に組み込むという形での開発を行う。マルコフ確率場は、直感的には、複数の対象物、あるいは、その背後にある構造に対し、仮想的なバネで連結された構造を仮定したものである。対象物の運動がこ

のバネに影響を受けるとすることで、複数の対象物の位置を互いのヒントとしながら同時に予測する．対象物に働く相互作用は対象物の違いにより様々に変わりうるため、対象に応じた空間的依存性、すなわち、相互作用モデルを設計する．

3. 研究の方法

ここでは中核となるアイデアに焦点を当てて説明する．標準的な粒子フィルタ(図1上)を細胞動画像に適用すると追跡対象物が密に存在することが原因となって追跡対象物の誤認が頻繁に起こる．本申請書での研究では、この問題を回避するために追跡対象物の時間依存性(運動モデル)に加え追跡対象物群自体やその背後にある空間的依存性を補助的に利用する(図1下)．細胞運動の空間的依



4. 研究成果

開発した手法を *C.elegans* の神経細胞に対する 4D ライブセルイメージングデータに適用し、Tokunaga et al. (Bioinformatics, 2014) で報告された手法とトラッキング精度を比較した．性能比較のための 4D ライブセルイメージングデータとして、上記 Tokunaga et al.により報告されたデータ II の D1, D2, D3 を利用した(図2)．

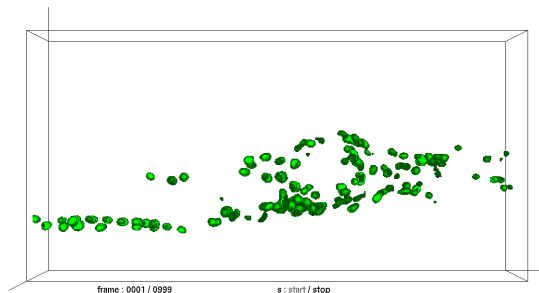


図2: トラッキング精度比較用データ．線虫頭部に存在する神経細胞の核を共焦点レーザー顕微鏡を用いて連続撮影したものである．各々の楕円体形状の物体がそれぞれ神経細胞の核である．生きた線虫を撮影しているため、神経細胞の位置がフレームごとに移動する．

それぞれのデータは解像度 512x256x20 の 3次元画像 500 フレームで構成される．3次元画像の背景ノイズレベルが z 座標により異なるため、背景ノイズレベルを各 2D 画像の蛍光強度の平均として推定し、その推定値を各ピクセルの蛍光強度から引くことでバックグラウンドノイズを除去した．次に salt-and-pepper ノイズを除去するために、3x3x1 のウィンドウサイズのメディアンフィルタ処理を行った．追跡結果の比較のため、細胞検出結果は両者とも RPHC アルゴリズム(Tokunaga et al. 2014)により得られたものを使用した．提案手法で必要とされるパラメータはデータ D1, D2, D3 で全て同じものに設定した．図3は Data II を構成する動画像に対する最終フレームの追跡結果を表す．結果の図から両者の手法で追跡結果に大きな食い違いがないことが分かる．より詳細

に追跡精度を比較するために、最終フレームでの追跡位置を利用し、以下のように追跡精度を評価した。

- 追跡位置が対象細胞から 5 ボクセル以内であれば追跡成功とする。
- 対象細胞が最終フレームで撮影画像中に存在しない場合は評価の対象としない。

表 1 に両者の手法の成功率を示す。提案手法は Tokunaga et al. らの手法と比較し、追跡精度が大きく向上していることが分かる。Data II を構成する動画像 D1, D2, D3 の中で D3 の精度が低いですが、これは最終フレーム撮影時の線虫の姿勢の違いに起因する。D1, D2 の最終フレームでは、線虫は標準的な姿勢をとっており、体の動きは緩やかである。一方で、D3 では頭部から尾部を結ぶ軸の方向に大きく体を収縮させており、体の動きが非常に早い。そのため、D3 での追跡精度が低くなっている。これらの結果は論文としてまとめられ、IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics に掲載が確定した。

表 1: Data II を構成する同画像データ D1, D2, D3 に対する最終フレームでの細胞領域追跡の正解率。

Data	Tokunaga <i>et al.</i> (2014)	SPF
D1 (120)	0.8000	0.9524
D2 (124)	0.6860	0.9669
D3 (111)	0.4467	0.8679

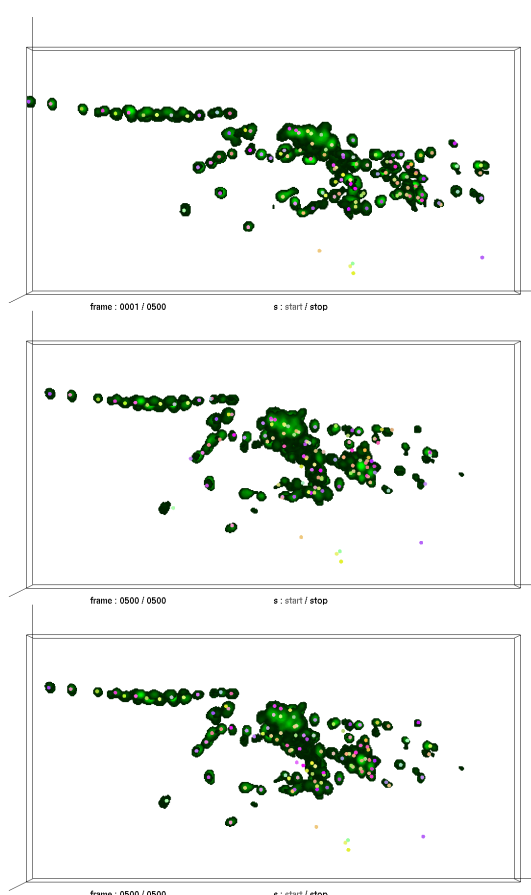


図 3: Data II を構成する動画像 D1 に対するトラッキング精度の比較。(上図) 追跡位置の初期値。追跡位置は色付きの円で示されている。(中図) Tokunaga et al. の手法による最終フレームの追跡結果。(下図) 提案手法による最終フレームの追跡結果。

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 2 件)

[1] Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Terumasa Tokunaga, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, Ryo Yoshida, SPF-CellTracker: Tracking multiple cells with strongly-correlated moves using a spatial particle filter, *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 1-9, 2017.

[2] Yu Toyoshima, Terumasa Tokunaga, Osamu Hirose, Manami Kanamori, Takayuki Teramoto, Moon Sun Jang, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Ryo

Yoshida, Yuichi Iino, Accurate Automatic Detection of Densely Distributed Cell Nuclei in 3D Space, *PLoS Computational Biology*, 12(6): e1004970:1-20, 2016

〔学会発表〕(計4件)

[1] 2015.9 Gaithersburg, MD, United States of America, Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Terumasa Tokunaga, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, and Ryo Yoshida. SPF-CellTracker: Tracking multiple cells with strongly-correlated moves using a spatial particle filter. Bioimage Informatics conference 2015.

[2] 2015.9 Tokyo, Japan, Osamu Hirose, Shotaro Kawaguchi, Terumasa Tokunaga, Yu Toyoshima, Takayuki Teramoto, Sayuri Kuge, Takeshi Ishihara, Yuichi Iino, and Ryo Yoshida. SPF-CellTracker: Tracking multiple cells with strongly-correlated moves using a spatial particle filter. GIW/InCoB, 2015.

[3] 2015.6 沖縄県恩納村, 広瀬修, 川口翔太郎, 徳永旭将, 豊島有, 寺本孝行, 池端久貴, 久下小百合, 石原健, 飯野雄一, 吉田亮. Tracking multiple cells with a spatial particle filter, 第21回 IBISML 研究会.

[4] 2015.5 福岡県福岡市, 広瀬修, 川口翔太郎, 徳永旭将, 豊島有, 寺本孝行, 久下小百合, 石原健, 飯野雄一, 吉田亮. 空間粒子フィルタによる多数の細胞の同時追跡. バイオイメージインフォマティクスワークショップ 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:

種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等:
<https://github.com/ohirose/spf>

6. 研究組織
(1)研究代表者

広瀬 修 (Hirose, Osamu)
金沢大学, 電子情報学系, 助教
研究者番号: 30549671

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者

川口翔太郎 (Kawaguchi, Shotaro)
金沢大学

徳永旭将 (Tokunaga, Terumasa)
九州工業大学

吉田亮 (Yoshida, Ryo)
統計数理研究所

豊島有 (Toyoshima, Yu)
東京大学

寺本孝行 (Teramoto, Takayuki)
九州大学

久下小百合 (Kuge, Sayuri)
九州大学

石原健 (Ishihara, Takeshi)
九州大学

飯野雄一 (Iino, Yuichi)
東京大学