

卒業論文

心筋細胞電子顕微鏡画像に基づく 機械学習を用いた筋原線維モデルの作成

2021 年 1 月 29 日提出

指導教員 波田野 明日可 講師



03-190182 小沢 宏輔

心筋細胞電子顕微鏡画像に基づく機械学習を用いた筋原線維モデルの作成

03190182 小沢 宏輔 指導教員：波田野 明日可 講師

Keywords : Myofibrils, Deep learning, Segmentation, Serial-Block-Face Scanning Electron Microscope

1. 緒言

現在医療の分野で原因や仕組みが解明されていない病気が多数存在するが、シミュレーション技術を用いることで原因や仕組み、予防法などを解明できる可能性がある。本研究では、心臓機能の低下と心疾患による心筋細胞の小器官の形態の変化の因果関係について注目する。

田中[1]の研究によって、深層学習を用いることで小器官を効率的に抽出できるようになった。さらに染谷[2]の研究によって、汎用性が向上し撮影環境などが異なる、別個体の細胞についても高い精度で抽出できるようになった。なお、田中が用いた細胞を細胞 A、染谷が用いた別個体の細胞を細胞 B と呼ぶことにする。

そこで本研究は、深層学習によって筋原線維を抽出し、筋原線維の微細構造モデルを作成することを目的とする。

2. 方法

心筋細胞の入力データは連続ブロック表面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM, Serial-Block-Face Scanning Electron Microscope) による撮影で取得した。試料の 3 次元構造を再構築することに長けている。

電子顕微鏡画像などのセグメンテーションに特化した深層学習モデルである CDeeo3M[3]を使用した。細胞 A、B15 組ずつの全 30 組を学習に用いた学習モデルと、細胞 B の教師データセット 15 組を学習に用いた学習モデルの二種類のモデルで抽出の精度を評価する。また、染谷が用いた強度調節を用いることで精度がどのように変化するのも評価する。その際教師データセット画像のみ強度調節を行ったモデルと、入力画像にも強度調節を行ったモデルで評価する。また両者とも教師データセットは全 30 組とした。精度の評価はピクセルベースで行い、以下の表 1 に基づき 4 通りに分類する。その後式 2.1、2.2、2.3 によりそれぞれ適合率、再現率、F 値を計算する。

Table 1 : Pixel-based segmentation result classification

	ラベルが正	ラベルが負
出力が正	TP : 真陽性	FP : 偽陽性
出力が負	FN : 偽陰性	TN : 真陰性

$$\text{適合率} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FP}) \quad (2.1)$$

$$\text{再現率} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN}) \quad (2.2)$$

$$\text{F 値} = 2\text{TP} / (2\text{TP} + \text{FP} + \text{FN}) \quad (2.3)$$

また、セグメンテーション後に田中の画像処理による分割処理を用いて筋原線維の微細構造モデルを作成する。

3. 結果と考察

3.1 学習モデルの比較

細胞 A、B のセグメンテーションの精度は表 2 の通り。細胞 B の教師データセット 15 組のみでは細胞 A の筋原線維を全く抽出できず一面黒であったため F 値は計算していない。

Table 2 : F-score of each model

	細胞 A	細胞 B
全 15 組	–	0.9197
全 30 組(調節なし)	0.5830	0.7761
教師のみ調節	0.5807	0.9215
教師と入力 調節	0.9584	0.9210

細胞 A については、教師データセット画像と入力画像ともに強度調節を行うことで 90%以上の F 値となり大きく向上している。細胞 B については、教師データセット 15 組のみで 90%以上の F 値であり、強度調節を行っても F 値はほとんど変化がない。しかし一枚ずつ比較していくと、教師データセット画像と入力画像ともに強度調節を行ったことで、筋原線維をはっきりと抽出できているスライスも多くみられた。以上から、教師データセット画像と入力画像に強度調節を行うことで、異なる細胞間での撮影環境の差が抑えられ、精度が向上すると考えられる。また細胞 B の全 15 組のモデルと全 30 組(強度調節なし)のモデルを比べると、強度調節を行わずに単純に異なる細胞の教師データセットを加えただけでは精度が落ちることがわかる。

3.2 分割処理の結果

分割処理によって作成した 3D モデルは、細胞外体積を除いて計算して体積率が 43.07%となった。筋原線維の体積率は 50~60%[4]であることから、筋原線維を取りこぼしていることがわかる。主な原因としては対象のセグメンテーション結果において取りこぼしがあったからだと考えられる。取りこぼしが目立つ画像は細胞外の部分が多い画像が多く、細胞外の部分が対象のセグメンテーション結果の精度を落としている可能性がある。分割処理結果をみると、異なる筋原線維を一つの筋原線維としてしまい輪郭が認識されていない画像もあれば、Z 帯の部分を輪郭と認識している画像もあった。これは分割処理において、目視によってしきい値を設定するのが難しいからだと考えられる。

4. 結論

深層学習によって筋原線維を抽出できることを確認した。また、細胞間の撮影条件の差を抑えるための強度調節が汎用性を高め、精度を向上させることがわかった。

一方で分割処理において、目視によってしきい値を設定するのは難しく、適切な精度を自動的に判断し設定するのが理想的である。

参考文献

- [1]田中宏明, “心筋細胞画像からの実計上モデル自動作成手法の開発,” 東京大学, 2019
- [2]染谷誠, “心筋細胞電子顕微鏡画像に基づく微細構造モデルの作成手法の開発,” 東京大学 2020
- [3]M. G. Haberl *et al.*, “CDeeo3M—Plug-and-Play cloud-based deep learning for image segmentation,” *Nat. Methods*, vol. 15, no. 9, pp. 677–680, 2018.
- [7]波田野明日可, “心筋細胞の微細構造を考慮した電気生理・代謝・力学統合マルチフィジックスシミュレーション,” 東京大学, 2012.

目次

1	序論.....	9
1.1	研究背景	10
1.1.1	医療とシミュレーションの可能性	10
1.1.2	心筋細胞と心疾患	10
1.2	過去の研究.....	10
1.2.1	手書きによる小器官抽出.....	10
1.2.2	ピクセル強度分布を利用した小器官抽出	11
1.2.3	深層学習を用いた心筋細胞内小器官抽出	11
1.3	研究の目的.....	12
1.4	本論文の構成	12
2	方法.....	14
2.1	心筋細胞	15
2.1.1	心筋細胞の微細構造	15
2.1.2	SBF-SEM	16
2.2	深層学習	17
2.2.1	深層学習概要	17
2.2.2	画像認識における機械学習と深層学習	17
2.2.3	CDeep3M	18
2.3	小器官抽出処理	19
2.3.1	教師データセット作成	19
2.3.2	入力イメージ画像の強度調節	19
2.3.3	筋原線維の抽出	21
2.3.4	分割処理	21
2.4	評価方法	23
2.4.1	セグメンテーション結果の分類.....	23
2.4.2	ピクセルベースの評価指標	24
2.4.3	3D モデルの評価	25
3	結果と考察.....	26
3.1	セグメンテーション結果の比較.....	27
3.2	強度調節の影響	31

3.3 分割処理後の結果.....	39
4 結言.....	44
4.1 結論.....	45
4.2 課題と展望.....	45
謝辞	46
参考文献.....	47

図目次

図 1.1	入力画像からモデル作成までの流れ.....	11
図 1.2	細胞 B のミトコンドリア 3D モデル.....	12
図 2.1	心筋細胞模式図.....	16
図 2.2	手書きで作成した筋原線維のデータセットの一例、 学習用 SEM 画像(左)、ラベル画像(右)	19
図 2.3	強度分布の一例、学習用 SEM 画像(左)、ラベル画像(右)	20
図 2.4	図 2.4 の強度調節後、心筋細胞 SEM 画像(左)とその強度分布(右)	21
図 2.5	大まかな分割画像	22
図 2.6	ガウスぼかし(左)、二値化(中)、核の識別(右)	23
図 2.7	手書きラベル(左)、2 次元分割画像(中)、3 次元分割画像(右)	23
図 2.8	しきい値に対する精度変化	25
図 3.1	細胞 A の入力画像(左)、正解ラベル(右).....	27
図 3.2	細胞 A を細胞 B15 組のデータセットでセグメントした結果(左)、 細胞 A を全 30 組のデータセットでセグメントした結果(右)	28
図 3.3	全 30 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像	28
図 3.4	細胞 B の入力画像(左)、正解ラベル(右).....	29
図 3.5	細胞 B を細胞 B15 組のデータセットでセグメントした結果(左)、 細胞 B を全 30 組のデータセットでセグメントした結果(右)	29
図 3.6	全 15 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像(左)、 全 30 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像(右)	30
図 3.7	強度調節後の細胞 A の入力画像(左)、正解ラベル(右).....	31
図 3.8	強度調節前の入力画像をセグメントした結果(左)、 強度調節後の入力画像をセグメントした結果(右)	32
図 3.9	強度調節後の入力画像をセグメントした結果の二値化画像	33
図 3.10	強度調節後の細胞 B の入力画像(左)、正解ラベル(右).....	34
図 3.11	強度調節前の入力画像をセグメントした結果(左)、 強度調節後の入力画像をセグメントした結果(右)	35
図 3.12	強度調節前の入力画像をセグメントした結果の二値化画像(左) 強度調節後の入力画像をセグメントした結果の二値化画像(右)	36
図 3.13	細胞 A の入力画像、強度調節前(左)と強度調節後(右)	37
図 3.14	細胞 A の画像の強度分布、強度調節前(上)と強度調節後(下)	37
図 3.15	細胞 B の入力画像、強度調節前(左)と強度調節後(右)	38
図 3.16	細胞 B の画像の強度分布、強度調節前(上)と強度調節後(下)	38

図 3.17 細胞 B の入力画像、強度調節前(左)と強度調節後(右)	39
図 3.18 強度調節前を入力画像をセグメントした結果(左) 強度調節後を入力画像をセグメントした結果(右)	39
図 3.19 入力画像(左)と分割処理結果(右)	40
図 3.20 入力画像(左)と分割処理結果(右)	41
図 3.21 入力画像(左)と分割処理結果(右)	41
図 3.22 入力画像(左)と分割処理結果(右)	42
図 3.23 入力画像(左)、セグメンテーション結果(右)、分割処理結果(中央).....	43

表目次

表 2.1	結果の分類	24
表 2.2	結果の分類	24
表 3.1	先行研究における各指標の値.....	28
表 3.2	F 値最大しきい値での各指標の値	29
表 3.3	F 値最大しきい値での各指標の値	30
表 3.4	F 値最大しきい値での各指標の値	33
表 3.5	F 値最大しきい値での各指標の値	35
表 3.6	筋原線維の個数、体積、平均体積、体積率.....	43

1 序論

1.1 研究背景

1.1.1 医療とシミュレーションの可能性

医療というのは主に専門家の医学的知識と医学的な経験及び統計的手法によって発展してきたが、アルツハイマー病や自己免疫疾患など、原因や仕組みが解明されていない病気や現象は未だに多く存在する。現在これらの未解明の病気や現象を解明するための新しい手法の開発が注目されている。新しい手法の一つが「シミュレーション」による手法だ。現在シミュレーション技術の高精度化により、製品を実際に製造して実験する代わりにシミュレーションで製品の検証を行うなど実用化が進んでいる。このシミュレーション技術を医療の分野にも取り入れ、ヒトをモデル化し数値シミュレーションを行うことで、未解明の病気の原因究明や治療方法の効果予測、予防などにつながる可能性がある。

1.1.2 心筋細胞と心疾患

心臓は心筋細胞と呼ばれる細胞で構成されており、この細胞の働きにより心臓全体の収縮反応が起き、全身に血液が流れるという仕組みである。心疾患を患っていない正常な心筋細胞では筋原線維に沿って列状に小器官が並んでいるのに対し、心疾患を患った心筋細胞では小器官の並びやミトコンドリアの形態が不規則になる。一方でこれらの心疾患による小器官の形態の変化と心臓の機能低下の因果関係というのは解明されていない。心筋細胞の微細構造モデルを作成しシミュレーションを行うことで、因果関係を明らかにすることができ、治療や予防につながる可能性がある。そこで、まずモデルを作成するために小器官を抽出する必要がある。

1.2 過去の研究

1.2.1 手書きによる小器官抽出

心筋細胞の小器官を手書きで抽出し分析している先行研究は多い。

E.A.Rog-Zielinska[1]は心筋細胞の電子顕微鏡画像からミトコンドリアの輪郭を手書きで抽出し、収縮、無負荷、伸長の三つの心筋細胞の力学状態に対するミトコンドリアの形状を評価している。またミトコンドリア同士の相互作用やT管などの他の細胞内組織との相互作用についても考察している。

Shouryadipita[2]も同様に心筋細胞電子顕微鏡画像からミトコンドリアを手書きで抽出し、ミトコンドリアの内膜、内部、筋原線維の三つの要素に分けFEメッシュをきって有限要素法によりモデリングしている。このモデルを用いてCrの拡散や酸素の濃度などについ

でシミュレーションし、ミトコンドリアの配置が心筋細胞内の代謝作用などに与える影響について考察している。

1.2.2 ピクセル強度分布を利用した小器官抽出

前章で紹介した研究のように、小器官抽出を手書きによって行うのは非常に手間がかかる上に一般性に欠ける。その課題の克服を試みたのが A.Hussain[3]の研究である。試料の連続電子顕微鏡画像から10枚おきに小器官の輪郭を手書きで抽出しピクセル強度分布を作成する。ピクセル強度分布を利用してセグメンテーションを行うアルゴリズムを、すべての電子顕微鏡画像に適用することで自動抽出を行っている。そして画像ごとのセグメンテーション結果を集合させることで3Dモデルを構築している。

すべての電子顕微鏡画像に対して小器官を手書きで抽出する必要があるという点で効率化されている。一方図1.2からわかるように誤認識されている箇所があり、また個々の小器官を集合体として抽出しているという点が課題である。

1.2.3 深層学習を用いた心筋細胞内小器官抽出

深層学習を用いることで効率的に小器官を抽出することに成功したのが田中[4]である。全400枚からなる心筋細胞の連続電子顕微鏡画像のうち50枚の画像からミトコンドリアを手書きで抽出し、その50枚を教師画像として深層学習を行った。深層学習により全400枚の入力画像に対し対象全体と輪郭を検出し、この二つの結果から3次元分割画像を作成している。またミトコンドリアの分割には画像処理を用いている。画像処理については2.3.4項で詳しく説明する。入力画像からモデル作成までの大まかな流れを図1.2に示す。

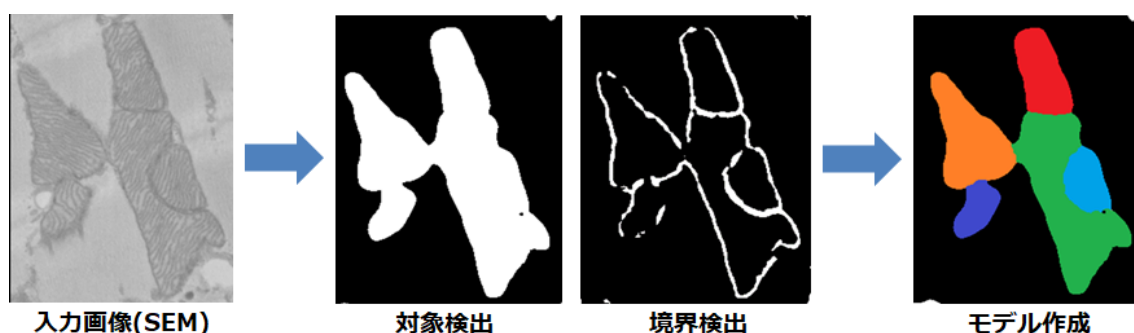


図 1.1 入力画像からモデル作成までの流れ

深層学習を用いた小器官抽出により効率的にモデル作成できるようになった。一方で田中が用いた全400枚の電子顕微鏡画像からなる心筋細胞(以下、細胞Aとする)に対しては抽出の精度が高かったが、別個体の心筋細胞に対しては抽出の精度が高いとはいえず個体差への汎用性が低いというのが課題である。

そこで個体差への汎用性が低いという課題を克服したのが染谷[5]である。細胞Aとは別で全690枚の電子顕微鏡画像からなる心筋細胞(以下、細胞Bとする)からミトコンドリアを手書きで抽出し教師画像を作成し、田中が用いた細胞Aの50枚の教師画像と合わせて深層学習を行った。そして細胞Bの教師画像数が抽出の精度に与える影響について考察した。また入力画像の強度を調節することで撮影環境の影響も抑え、汎用性、精度の高い抽出を可能にした。抽出結果からミトコンドリアの3Dモデルを作成し、体積率や個々のミトコンドリアを楕円球近似した際の配向性、離心率などの点からモデルの妥当性を評価している。染谷が作成した細胞Bのミトコンドリアの3Dモデルを図1.3に示す。

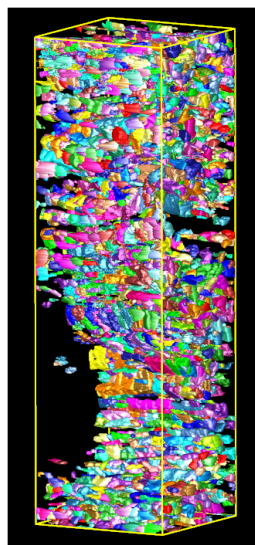


図 1.2 細胞 B のミトコンドリア 3D モデル

1.3 研究の目的

過去の研究では深層学習により、ミトコンドリアのモデル作成が効率的に行えるようになった。しかしミトコンドリアなどの小器官の情報だけで、その形態を評価するのは難しい。筋原線維方向やZ帯の情報を用いることで初めて正確な評価が可能になると考えられる。

そこで本研究では筋原線維を深層学習によって抽出し、筋原線維の微細構造モデルを作成することを目的とする。この目的を達成し、ミトコンドリアやT管といった小器官のモデルと合わせることで、心筋細胞全体のモデルの作成、シミュレーションが可能となり、心疾患による心筋細胞の形態の変化と心臓の能力低下の因果関係について考察する、という大きな目的を将来的に果たせるのではないかと考えている。

1.4 本論文の構成

本論文における構成を以下に示す。

第 1 章では、研究背景、過去の研究、そして本研究の目的について述べた。

第 2 章では、心筋細胞の微細構造について述べた後、深層学習による筋原線維抽出や強度調節、画像処理、そして精度の評価などの方法について述べる。

第 3 章では、結果を述べ、考察を付す。

第 4 章では、本研究における結論と課題について述べる。

2 方法

2.1 心筋細胞

2.1.1 心筋細胞の微細構造

以下は文献[6]に基づき本研究に必要な部分を付け加えた。成人の心臓において心筋細胞は体積比75%を占めており、長さ約 $100\mu\text{m}$ 、直径約 $10\mu\text{m}$ の円柱状である。心筋細胞の表面は細胞膜に覆われており、内部は筋原線維、ミトコンドリア、横行小管(T管、Trabsverse Tubules)、筋小胞体(SR、Salcoplasmic Reticulum)などの小器官から構成されている。心筋細胞微細構造の模式図を図2.1[6]に示す。

筋原線維は幅約 1μ の円筒状であり筋肉の繊維方向に多重に配列している。内部はアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの、たんぱく質の分子集合体である2種類のフィラメントから成っている。アクチンフィラメントはアクチンというタンパク質からなり太さ約 8nm 、長さ $1\mu\text{m}$ 、ミオシンフィラメントはミオシンというタンパク質からなり太さは約 16nm 、長さ $1.5\mu\text{m}$ となっている。筋原線維の形態的、機能的単位はサルコメアと呼ばれ、サルコメアの長さ(サルコメア長)は収縮時に約 $2\mu\text{m}$ 、弛緩時に約 $2.5\mu\text{m}$ である。筋原線維が収縮することで心筋細胞全体が収縮する。サルコメアを軸方向に対して垂直に区切る構造はZ帯と呼ばれる。また筋原線維には横紋がみられ、明るく見える部分はI帯(Iband、Izone)、暗く見える部分はA帯(Aband、Azone)と呼ばれる。筋原線維は体積比で50~60%を占める。

ミトコンドリアは、表面を内膜と外膜と呼ばれる2種類の脂質膜に覆われており、内膜に覆われた内側をマトリックス、内膜と外膜に挟まれた部分を膜間腔と呼ぶ。細胞のエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)を生成し、また体内のカルシウム(Ca^{2+})濃度や鉄の濃度を調整する働きをもつ。他にも好気呼吸の場であり、細胞のアポトーシスに関わるなど多くの機能をもつ。直径は約 $0.5\mu\text{m}$ で形状は球形、円筒状、網目状など細胞の置かれている環境により様々である。体積比で20~30%を占める[6]。

T管は、細胞膜が発達してできた管状の器官で、Z帯において筋原線維を取り巻くように配置している。表面での刺激をSRまで伝える経路であり、両側からSRの両端(終末槽)が接しており三連構造になっている。T管には Ca^{2+} を放出するL型カルシウムチャネルが形成される。 Ca^{2+} を放出することで細胞全体を収縮させる働きがある。

SRは筋原線維を囲うように配置しており、 Ca^{2+} の制御を行う働きをもつ。T管と向かい合うJunctional SR(JSR)、それ以外のSRであるNetwork SR(NSR)の2種類のSRがある。JSRには Ca^{2+} を放出するリアノジンレセプタ(RyR)が形成される機能、NSRには Ca^{2+} をSR内に汲み上げる機能がある。膜電位によって開くT管のL型カルシウムチャネルと、 Ca^{2+} イオンによって開くJSRのRyRを Ca^{2+} 放出機能(CaRU 、Calcium Release Unit)と呼び、筋収縮を起こす Ca^{2+} の多くがRyRから放出されている。

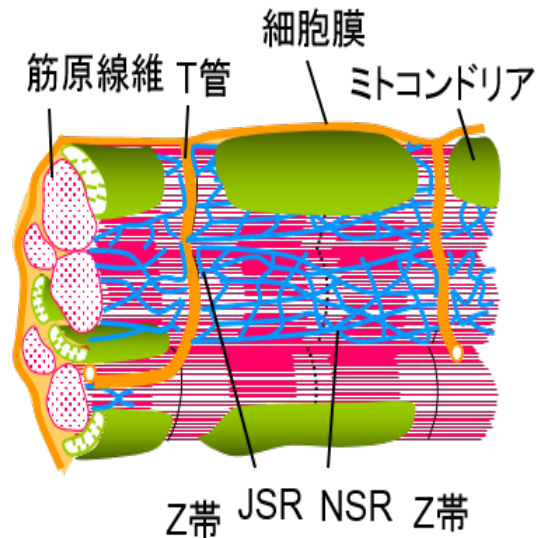


図 2.1 心筋細胞模式図[6]

心筋の収縮・弛緩機構を簡単に述べる。収縮機能は、まず膜電位の変化によりT管のL型カルシウムチャネルが開き Ca^{2+} を放出する。放出された Ca^{2+} によってJSRのRyRが開くことで多くの Ca^{2+} がさらに放出され、細胞内の Ca^{2+} 濃度が高まる。これにより Ca^{2+} が、筋原線維の細い筋系の構成タンパクの一種であるトロポニンと結合し収縮力が発生する。弛緩機能は、細胞内の Ca^{2+} 濃度が高まるとNSRによって Ca^{2+} がSR内に取り込まれ、T管やSRを介し細胞膜を通して細胞外へ放出される。これにより細胞内の Ca^{2+} 濃度が低くなり心筋が弛緩する。このようにして心筋の収縮・弛緩が起きている。

2.1.2 SBF-SEM

ここでは本研究の入力データ取得の際にも使用している、心筋細胞の微細構造の撮影法の一つであるSBF-SEMについて簡単に述べる。

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBF-SEM、Serial-Block-Face Scanning Electron Microscope)は、試料ブロック表面をダイヤモンドナイフで切削し、表面の構造をSEMにより記録する。SEM内部にマイクロームという器具が取り付けられており、切削しながら観察することで連続断面画像を得る。得られた画像データからある構造を抽出することで、試料の3次元の構造を再構築し、体積や表面積といった立体的パラメータの解析を可能にする。生体試料を観察する際には、試料を樹脂に包埋したブロック状の試料を切削して観察する。樹脂を用いることで記録が困難である小さく薄い生体試料からも質の高いデータを得ることができる。

2.2 深層学習

2.2.1 深層学習概要

ニューラルネットワーク(NN)は機械学習(Machine Learning)の1種である。機械学習のための技術としては、NN以外にニアレストネイバー法、決定木など様々な技術が挙げられる。NNは順に入力層・隠れ層・出力層と呼ばれる層を持ち、各層のノードは前のノードとエッジで繋がっている。エッジは重みを持ち、ノードに重みをかけた各値を足し合わせた値を各層の活性化関数と呼ばれる関数を介して次の層に渡す。NNは基本的に前の層のノードの値、接続エッジの重みの値、層が持つ活性化関数によって計算される。活性化関数はNNにおいて、線形変換を行った後に適用する、非線形関数もしくは入力をそのまま出力する恒等関数である。隠れ層は複数の層を持つことができ、特に深い隠れ層を持つNNを深層学習(Deep Learning)と呼ぶ。

深層学習には教師あり学習、教師なし学習、強化学習が存在するが、本研究では教師あり学習を用いる。教師あり学習では学習に用いる学習用データとラベルを多数用意する。学習用データは処理したい入力の画像データ、ラベルは求める出力データであり、学習用データとラベルの組み合わせをデータセットと呼ぶ。次に深層学習のネットワークに学習用データを入力し、出力された結果と答えであるラベルの誤差が小さくなるように各エッジの重みを変化させる。この学習を繰り返すことで重みが最適化され、未知の入力に対しても最適化された出力を得ることができる。

2.2.2 画像認識における機械学習と深層学習

本研究では、心筋細胞の電子顕微鏡画像から筋原線維に対してセグメンテーションを行った。セグメンテーションとは画像処理の1種で、対象とそれ以外とを認識し対象のみを抽出する技術である。

画像処理を行う際には画像認識を行うことから始める。画像認識では対象物の特徴を数値化した特徴量を基に対象物を検出する。簡単な例では、あるしきい値を定め画像の強度がしきい値より上か下かで対象物を判断するという方法が挙げられる。他にも強度の勾配やサイズ、形状など様々な特徴量がある。画像認識では特徴量に関して何を特徴とするのか、特徴量はどのくらいの値にするのかを設定する必要があるが、特徴と値の組み合わせは無限にあるため、人間が適切な画像認識のパラメータを選択するのは困難である。一方で人間が設定した場合、明確な根拠に基づいた結果を得ることができる。

機械学習を用いた画像認識は、人間が特徴を設定し、値に関しては機械に学習させ最適な特徴量を決定するというものである。学習させるための多数のサンプルの用意と人間が

特徴を決めるという作業が必要であるが、サンプルを用意することで適切なパラメータを決定でき、未知の入力画像に対しても有効な画像認識を行うことができる。

本研究で用いた深層学習を用いた画像認識は、特徴の設定も特徴量の決定も機械が自動で行うものである。一般的な画像認識も機械学習による画像認識も特徴に関して人間が判断しているが、複雑な画像処理になるほど適切な画像認識のパラメータの設定が難しくなる。一方深層学習であればサンプルを用意するだけで自動的に特徴を検出し適切なパラメータを決定できる。

機械学習は特徴を人間が設定するため、限定的で構造化されたデータを利用する場合に用いられることが多い。深層学習は値のみならず特徴も機械の学習により決定するため、機械学習を用いる場合と比べてより複雑な非構造的なデータを利用する場合に用いられることが多く、本研究の画像認識に加え、音声認識や自然言語処理などの分野において適用される。深層学習については、深層学習の中でどのような特徴を抽出しているのかを完全に把握できないことなどの問題点が指摘されているが、画像認識の精度に関しては人間より高い精度で検出できたという報告がされている。

2.2.3 CDeep3M

以下は文献[7]に基づき本研究に必要な部分を付け加えた。必要な本研究では CDeep3M[7]の深層学習を使用した。CDeep3Mは Amazon Web Service上に容易に構築可能な、光学顕微鏡、電子顕微鏡、X線顕微鏡画像のセグメンテーションに特化した深層学習モデルである。深層学習モデルに畳み込みニューラルネットワーク(CNN、Convolutional Neural Network)を使用している。ここでCNNとは、畳み込み層とプーリング層を組み合わせたNNである。

CDeep3Mの仕組みについて簡単に述べる。まず、入力画像と白黒の二値化ラベルのデータセットを入力する。preprocessTriningDataコマンドによりデータセットの強化を行う。データセットは回転や反転させて新たなデータセットを作成することで強化されている。強化したデータセットを用いてruntrainingコマンドにより3通りの学習モデルを作成する。最後にrunpredictionコマンドにより作成された3通りの学習モデルごとに入力画像に対するセグメンテーションを行い、3通りの結果を組み合わせで最終的な結果を出力する。

2.3 小器官抽出処理

2.3.1 教師データセット作成

本研究では走査型電子顕微鏡(SEM)で観測した心筋細胞画像を学習用データ、手書きで抽出した筋原線維をラベルとして学習を行う。筋原線維の輪郭を線でなぞり、輪郭の内部を白、それ以外を黒とした。データセットの一例を図2.2に示す。

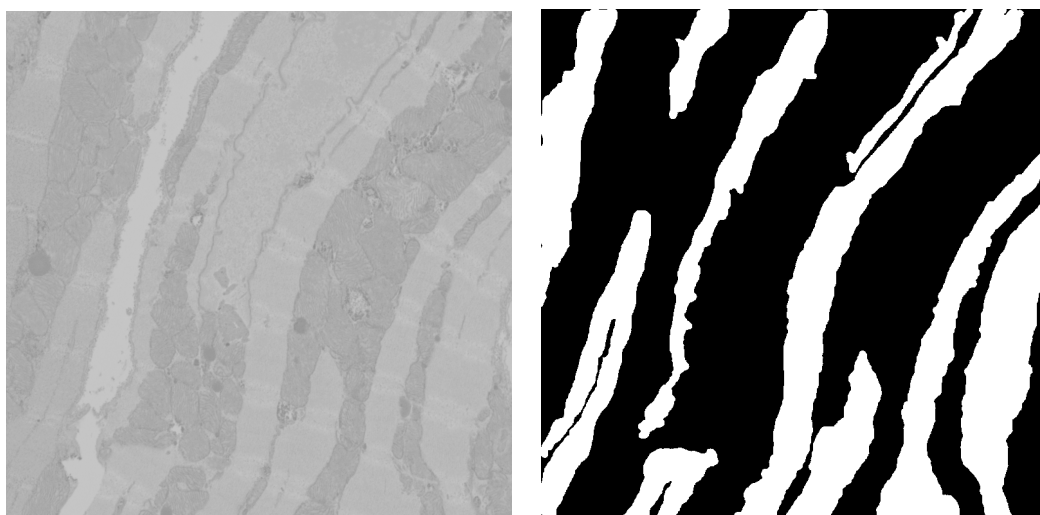


図 2.2 手書きで作成した筋原線維のデータセットの一例

学習用 SEM 画像(左)、ラベル画像(右)

データセットは細胞Aの画像で15組、細胞Bの画像で15組作成した。

なお、これらの心筋細胞SEM画像はカリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD、University of California, San Diego)の星島様に提供して頂いた。正常マウスの心筋細胞で、細胞A、Bの画像はともに4096pixel×4096pixelであり、1枚のスライス厚は70nmとなっている。細胞Aは全400枚のスライス、細胞Bは全690枚のスライスから成る。1pixelは3.5nmである。

2.3.2 入力イメージ画像の強度調節

心筋細胞の入力画像の強度分布は、撮影環境の差によって変化していることがある。強度の変化の影響を小さくするために入力画像の強度分布を調節する。この強度調節は染谷の手法に準じて行う。心筋細胞画像の強度分布の一例を図 2.3に示す。横軸が強度値で0～255までの値を取り、縦軸がピクセル数である。

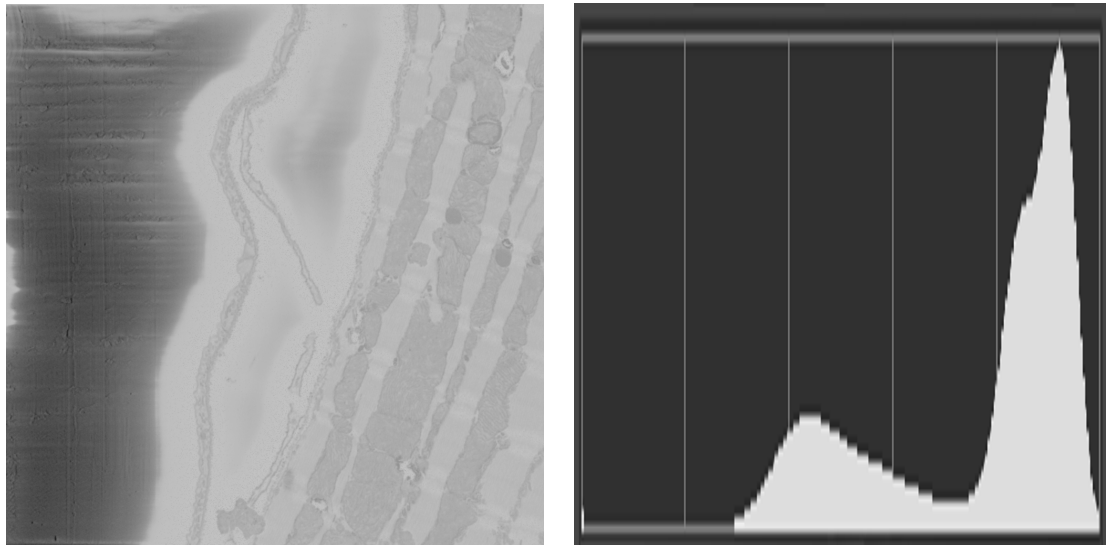


図 2.3 強度分布の一例

心筋細胞 SEM 画像(左)とその強度分布(右)

基本的に心筋細胞SEM画像は図2.5のように2つのピークを持つ。1つ目のピークはミトコンドリアによるもので、2つ目のピークは筋原線維によるものである。各々の画像間の強度分布の差を抑えるために、2つのピークの位置を全学習用ラベル画像で測定し平均値を算出する。その平均値に入力画像すべてのピーク位置があうようにピクセル強度を調節する。図2.4のSEM画像の強度調節後を図2.4に示す。

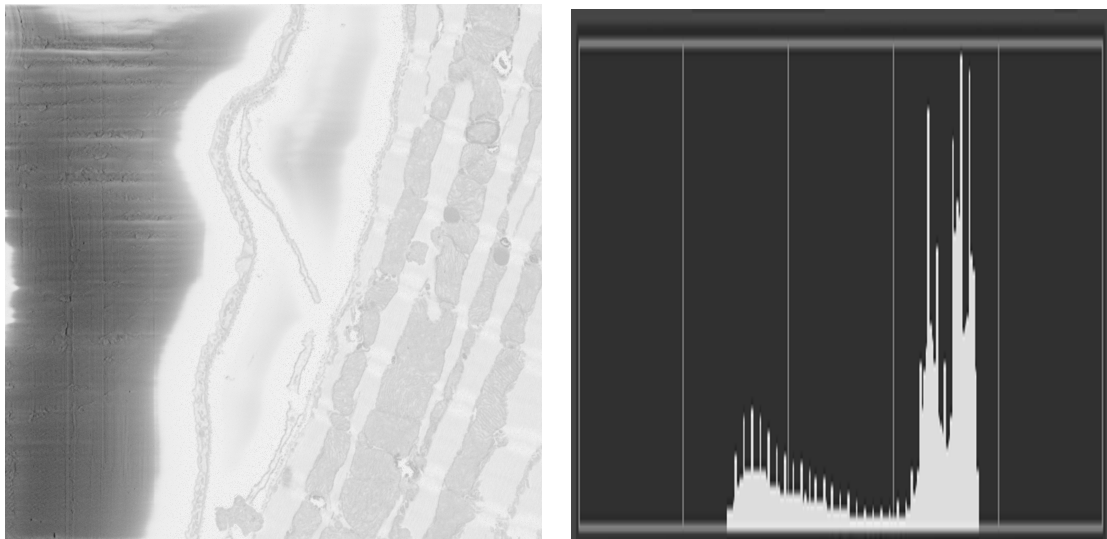


図 2.6 図 2.4 の強度調節後

心筋細胞 SEM 画像(左)とその強度分布(右)

なお、強度調整については式2.1に基づき行った。 x は変更前の入力画像のピクセル強度、 x' は変更後の入力画像のピクセル強度、 $P1$ は学習用画像のミトコンドリアを示す1つ

目のピーク位置の平均値、P2は学習用画像の筋原線維を示す2つ目のピークの平均値、p1は入力画像の1つ目のピーク位置の平均値、p2は入力画像の2つ目のピーク位置の平均値である。

$$\begin{cases} 0 \leq x \leq p1 : x' = x \times \frac{P1}{p1} \\ p1 < x \leq p2 : x' = P1 + (x - p1) \times \frac{P2 - P1}{p2 - p1} \\ p2 < x \leq 255 : x' = P2 + (x - p2) \times \frac{255 - P2}{255 - p2} \end{cases} \quad (2.1)$$

2.3.3 筋原線維の抽出

2.3.1で述べたように細胞Aの15組の教師データセット、細胞Bの15組の教師データセットを学習に用いた。細胞Aのみ15組、全30組の教師データセットから学習モデルを作成した。また、2.3.2で述べた強度調節の有無でセグメンテーション結果に影響があるかどうかを評価する。

セグメンテーションの結果は0,1ではなく確率分布で出力される。確率分布においては対象物である確率が高いピクセルほど強度が255に近く白で、確率が低いほど強度が0に近い黒で出力される。

さらに対象の抽出と同様に、輪郭の学習及び抽出も行う。輪郭の学習には対象の抽出の際に手書きで作成した輪郭を白くぬりつぶさず輪郭のままでラベルとして使用した。輪郭を抽出することで後に述べる分割処理が可能になる。

2.3.4 分割処理

小器官の対象の抽出の次に筋原線維同士の境界を作成し分割する。この分割処理は田中の手法に準じて行う。分割処理は(1)大まかな分割処理、(2)小さな核の抽出、(3)抽出した核を識別、(4)セグメンテーションに合わせて核の膨張、分割画像の作成、(5)(1)~(4)を3次元に適用、の5段階で構成されている。

まず深層学習による対象と輪郭のセグメンテーション結果をそれぞれ二値化する。画像の対象と輪郭のセットから色の値を入手し、全ピクセルに対して対象から輪郭の色の値を差し引くことで大まかな分割画像を作成する。大まかな分割画像を図2.5に示す。



図 2.5 大まかな分割画像

次に大まかな分割画像から完全に分離した小さな核を抽出する。その際ガウスぼかし(gaussian ぼかし、Gaussian Blur)と二値化を用いる。ガウスぼかしは画像のぼかし手法の1つで、ガウス関数と周辺ピクセルの積を足し合わせることで値を決定する。2次元のガウス関数の式を2.2に示す。 σ はガウス係数、 x,y は対象ピクセルからの距離である。ガウス係数は x,y 方向に何ピクセル分を対象としてぼかすかという量に相当し、任意に決めることができる。ただしガウス関数を足し合わせて1になるように x,y の範囲を決めなければならない。

$$G(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (2.2)$$

ガウスぼかしを行った画像に対しピクセル強度が255のものだけが残るように二値化処理することで核を抽出する。抽出後それぞれの核を別々の核と認識するための処理を行う。処理方法は、最初に画像のピクセルの値を順にみる。白いピクセルがあった場合そのピクセルにマークをつける。そのマークを周辺の白いピクセルに膨張させていき、全ての繋がっている白いピクセルにマークをつける。そしてまだマークされていない白いピクセルに同様の処理を繰り返すことで、画像内の全ての核に別々のマークをつけて識別することができる。ガウスぼかし、二値化、核の識別の一例を図2.6に示す。



図 2.6 ガウスぼかし(左)、二値化(中)、核の識別(右)

核を識別した後、セグメンテーション結果に合わせて核の膨張を行う。まず対象のセグメンテーション結果に核のマークをつける。各マークの周り1ピクセルにマークを膨張させる。その際他のマークに干渉しないようマークされていない白いピクセルのみに膨張させる。これを繰り返し他のマークと接するピクセルを黒くすることで分割画像を得る。

この分割処理を3次元に拡張する。2次元の分割のみでは画像1枚ごとに分割するため、形状等の影響が大きくなり切るべきでない部分まで余分に分割してしまう可能性がある。z軸を定義し分割処理を3次元に拡張することで、z軸方向のつながりもふまえて分割するかどうかを判断できる。そして得られた3次元分割画像の輪郭を抽出し足し合わせることでモデルを作成する。手書きのラベルから3次元分割画像までの流れを図2.7に示す。

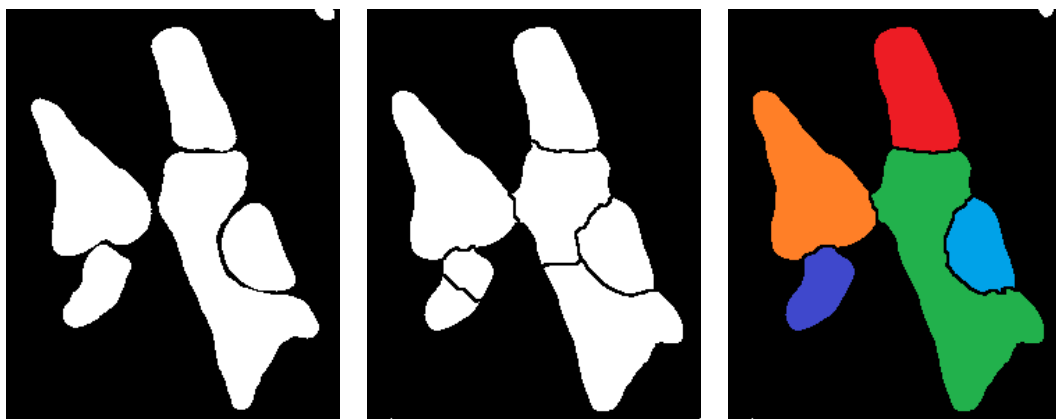


図 2.7 手書きラベル(左)、2次元分割画像(中)、3次元分割画像(右)

2.4 評価方法

2.4.1 セグメンテーション結果の分類

2.3.2で述べたように画像は1つ1つピクセルごとに色の情報があり、白黒画像では0~255の値を持つ。ピクセルベースの結果は真陽性(TP、True Positive)、真陰性(TN、True Negative)、偽陽性(FP、False Positive)、偽陰性(FN、False Negative)の4種類に分類され

る。TPは正のピクセルを正、TNは負のピクセルを負と正しく判断した場合、FPは負のピクセルを正、FNは正のピクセルを負と誤って判断した場合である。4通りをまとめた表2.1を示す。またセグメンテーション結果において正は白、負は黒を指しており、色で4通りの分類をした場合を表2.2に示す。

表 2.1 結果の分類

	ラベルが正	ラベルが負
出力が正	真陽性 TP : True Positive	偽陽性 FP : False Positive
出力が負	偽陰性 FN : False Negative	真陰性 TN : True Negative

表 2.2 結果の分類

	TN	FP	FN	TP
正解ラベル				
セグメント 結果				

2.4.2 ピクセルベースの評価指標

ピクセルベースでの分類結果に基づき評価指標を定める。最も簡単な評価指標は正解率で評価する指標である。正解率とは2つの画像の各ピクセルが一致している割合である。しかし正解率を指標として用いると、単に画像の中で多い値が支配的になるため全ての場合において適切とは言えない。目的や対象に応じて適切な評価指標を用いる必要がある。

そこで本研究ではセグメンテーションにおいて用いられることが多い適合率(Precision)、再現率(Recall)、F値(F-score)の3つの評価指標を用いる。適合率は偽陽性を低く抑えることを目的としているため、対象以外を誤って抽出してしまうことを防ぐが、対象を正しく抽出できているとは限らない。再現率は偽陰性を低く抑えることを目的としているため、対象を正しく抽出できていることを保証するが、対象以外を抽出しないとは限らない。すなわち適合率と再現率はある画像に対してトレードオフの関係にある。その両者の調和平均をとった指標がF値である。適合率の計算式を式2.3に、再現率の計算式を式2.4に、F値の計算式を式2.5に示す。

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (2.3)$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (2.4)$$

$$F - score = \frac{2 \times Recall \times Precision}{Recall + Precision}$$

$$= \frac{2 \times TP}{2 \times TP + FP + FN} \quad (2.5)$$

セグメンテーションの結果は確率分布で出力され、この出力を白黒であるラベル画像と比較し精度を評価するために出力を二値化する必要がある。しかし二値化するしきい値によって精度が大きく変わるため、出力結果に対してしきい値を0~255まで変化させ、最もF値が高くなるしきい値を探索する。しきい値に対する精度の変化のイメージを図2.8に示す。横軸がしきい値、縦軸が評価指標の精度である。

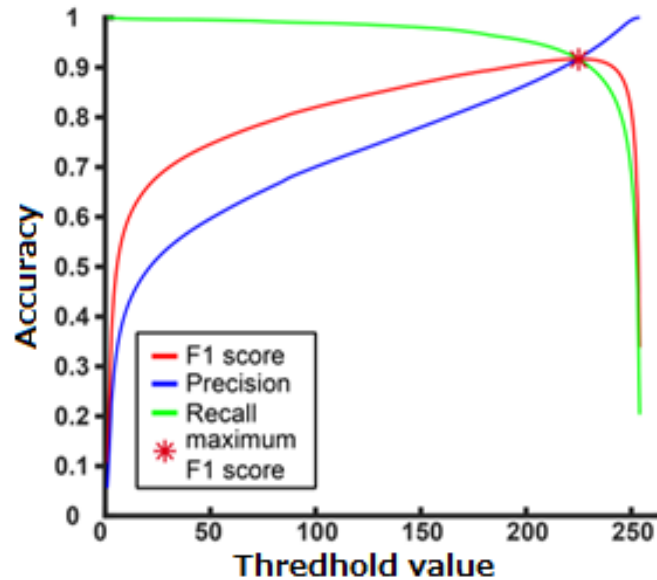


図 2.8 しきい値に対する精度変化

F値が最大になるしきい値は画像によって異なるため、画像ごとに適切なしきい値を探索しその平均を全体のしきい値とする。

2.4.3 3D モデルの評価

分割処理後に細胞 B について 3D モデルを作成する。そのモデルを筋原線維の個数、体積、細胞内体積率の点から評価する。また、分割処理において対象のセグメンテーション結果は全 30 組、データセット画像と入力画像に強度調節を行ったモデルによって抽出した結果を用いた。

3 結果と考察

3.1 セグメンテーション結果の比較

最初にミトコンドリアを抽出した先行研究における適合率、再現率、F値を表3.1に示す。

表 3.1 先行研究における各指標の値

	適合率	再現率	F値
先行研究	0.922	0.967	0.948

筋原線維を対象として、深層学習を行ったセグメンテーション結果の一例を図3.1、図3.2に示す。図3.1は細胞Aの入力画像と正解ラベル、図3.2は左が細胞Bのみ15組、右が細胞A、細胞Bともに15組のデータセットで学習を行い、細胞Aをセグメントした結果である。

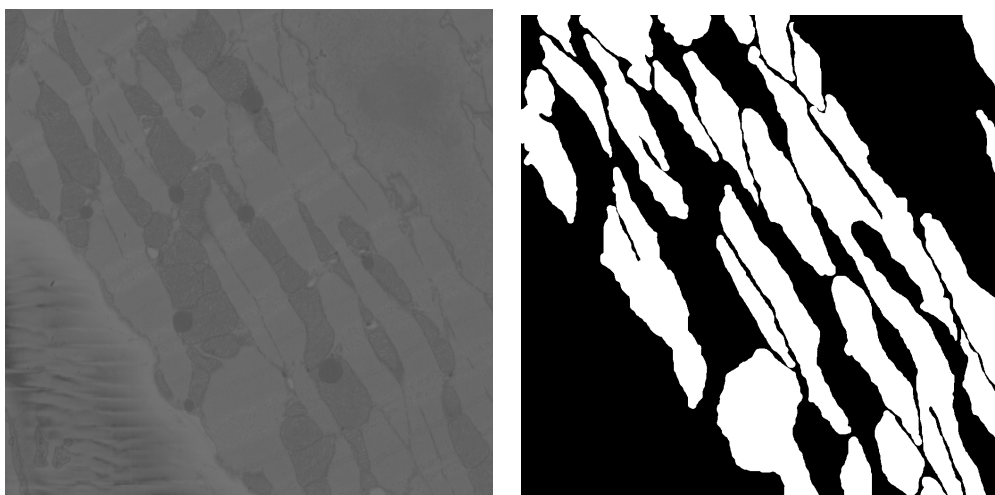


図 3.1 細胞 A の入力画像(左)、正解ラベル(右)

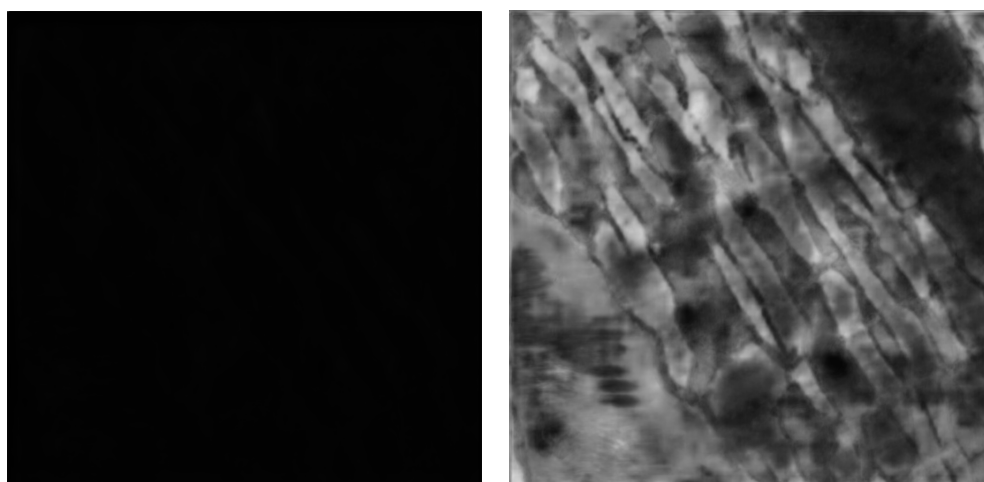


図 3.2 細胞 A を細胞 B15 組のデータセットでセグメントした結果(左)、
細胞 A を全 30 組のデータセットでセグメントした結果(右)

図3.2から細胞B15組のみだと何も抽出できておらず真っ黒になっていることがわかる。一方細胞A15組を加えると細胞B15組のみに比べると抽出できていることがわかる。それでも正解ラベルと比較すると全体的に暗く、抽出できている部分もぼんやりと白くなっている程度である。全30組のモデルにおける適合率、再現率、F値を表3.2に示す。ただし細胞A15組のデータセットにおいて、図3.2の左の画像のみならず全てのスライスにおいて抽出できていないことから各指標を計算する必要がないと考えた。

表 3.2 F 値最大しきい値での各指標の値

	適合率	再現率	F値
全30組(しきい値57)	0.4403	0.8996	0.583

セグメンテーション結果をF値が最大になるしきい値で二値化した結果を図3.3に示す。

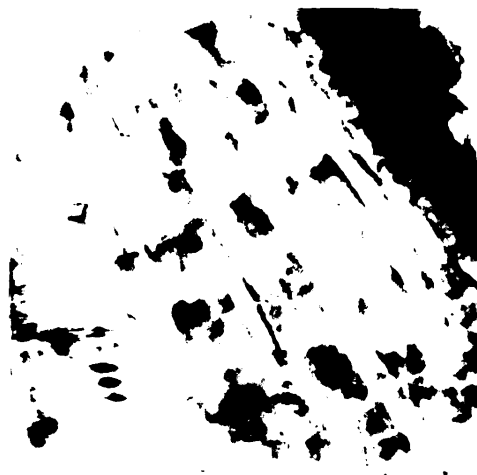


図 3.3 全 30 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像

図3.1の正解ラベルと図3.3を比べると、セグメンテーション結果では正解ラベルより白い面積が明らかに大きい。また本来筋原線維ではない部分を誤って抽出しているピクセルが多い。そのため偽陽性が多くなり適合率が先行研究に比べて50%以下になっていると考えられる。

細胞Bをセグメントした結果の一例を図3.3、図3.4に示す。図3.3は細胞Bの入力画像と正解ラベル、図3.4は左が細胞Bのみ15組、右が細胞A、細胞Bともに15組のデータセットで学習を行い、細胞Bをセグメントした結果である。

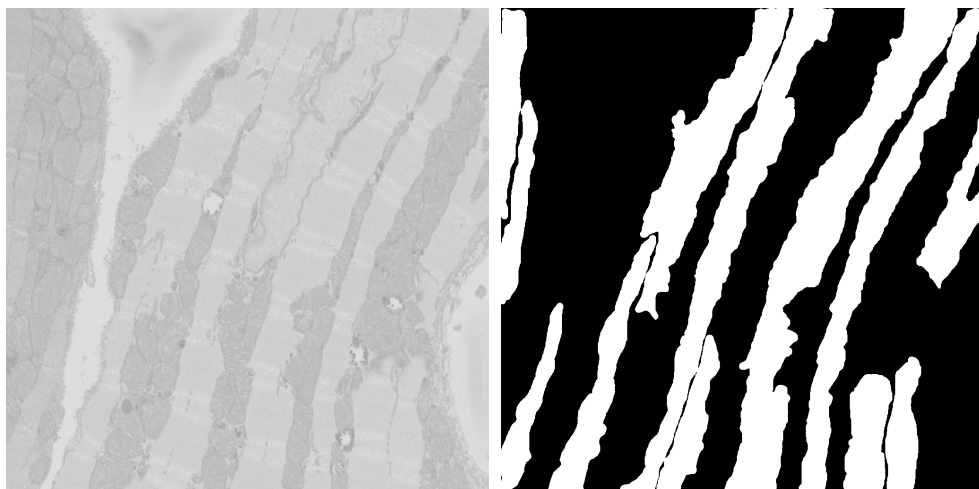


図 3.4 細胞 B の入力画像(左)、正解ラベル(右)

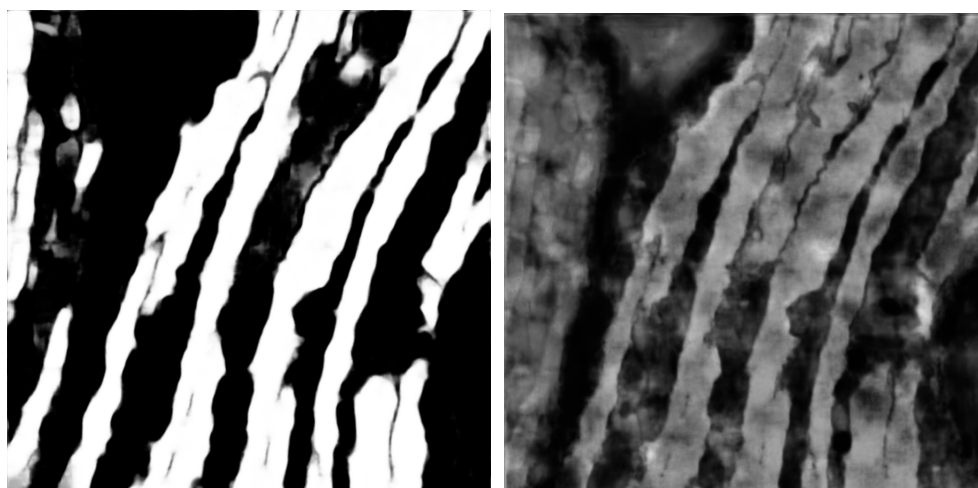


図 3.5 細胞 B を細胞 B15 組のデータセットでセグメントした結果(左)、
細胞 B を全 30 組のデータセットでセグメントした結果(右)

図3.5の左と図3.4の正解ラベルを比べると目視の範囲ではかなり精度良く抽出できていることがわかる。一方図3.5の2枚の画像を比べると、細胞Aのデータセットを加えたことで抽出の精度が明らかに悪くなっている。2つのモデルにおける適合率、再現率F値を表3.3に示す。

表 3.3 F 値最大しきい値での各指標の値

	適合率	再現率	F値
全15組(しきい値139)	0.8906	0.9509	0.9197
全30組(しきい値75)	0.7194	0.8473	0.7761

セグメンテーション結果をF値が最大になるしきい値で二値化した結果を図3.6に示す。

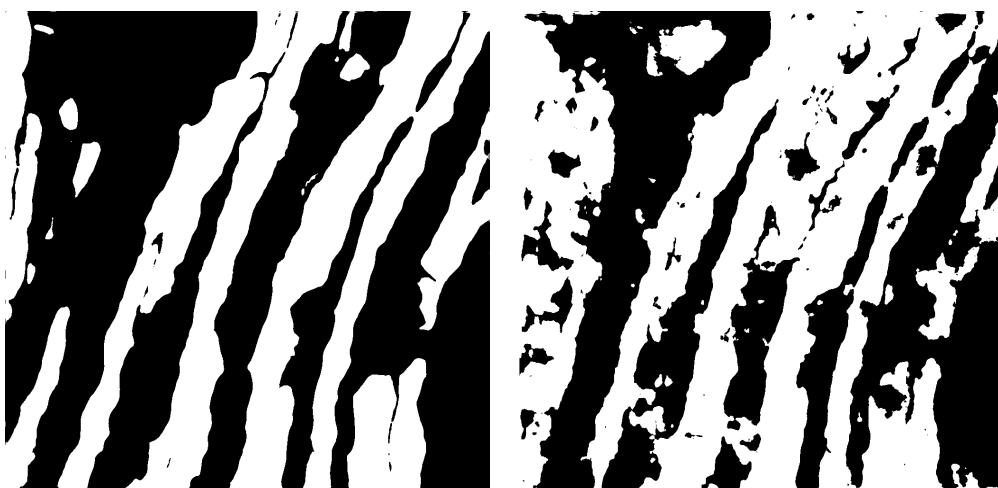


図 3.6 全 15 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像(左)

全 30 組のデータセットでセグメントした結果の二値化画像(右)

全15組の各指標の値は先行研究と比べると差が5%以内で精度が高いと言える。各指標の中では適合率の差が3%と一番大きく、画像の左上部や中央より右寄り上部で偽陽性がある。この偽陽性の部分は正解ラベルを作る際にも判別が付きにくかった部分であり、また画像左部分には近いピクセル強度でミトコンドリアと筋原線維が存在していることがわかる。人間の目で丁寧に判断が必要な部分に関しては深層学習では誤ってしまうことがあると考えられる。

全30組の各指標の値は先行研究と比べると適合率は20%、再現率は12%、F値は17%の差があり、全15組と比べるとそれぞれ順に17%、10%、14%の差がある。目視でも確認できたように全15組と比べると抽出の精度が落ちていることがわかる。図3.6の左右の画像を比べると全30組では白い面積が大きく偽陽性が多い。そのために適合率において一番大きな差ができていていると考えられる。さきほど述べた人間の目でも容易には判断できない部分に関しては全15組の場合よりも誤っている部分が多く、また画像を縦中央を走る黒の部分でも偽陽性が目立つ。縦に走っている筋原線維についても全15組では穴が空いたような黒の部分が数箇所あり、その部分が偽陰性にカウントされその結果再現率でも10%の差がついたと考えられる。

染谷の研究では、深層学習に用いるデータセットの組数が増えるほど各指標の値は大きくなり抽出の精度も高くなった。しかしここでは細胞A15組のデータセットを加えることで細胞Bにおける抽出については精度が落ちた。これは細胞Aと細胞Bの画像の撮影環境が異なるということが原因であると考えられる。図3.1の細胞Aの画像と図3.4の細胞Bの画像を比べると細胞Aの画像は極端に暗いというのも撮影環境の差の一つと言える。そこで2.3.2で述べた画像の強度調節を行うことで、撮影環境の差をなるべく抑えることを考える。

3.2 強度調節の影響

強度調節がセグメンテーション結果に与える結果を示す。本研究ではデータセットの画像に強度調節を行い、(1)強度調節前の入力画像をセグメントする場合、(2)強度調節後の入力画像をセグメントする場合、の2通りで比較した。2通りとも細胞A15組、細胞B15組の全30組のデータセットを深層学習に用いた。

細胞Aをセグメントした結果の一例を図3.7、図3.8に示す。図3.7は細胞Aの強度調節後の入力画像と正解ラベル、図3.8は左が強度調節前の細胞Aの画像をセグメントした結果、右が強度調節後の細胞Aの画像をセグメントした結果である。

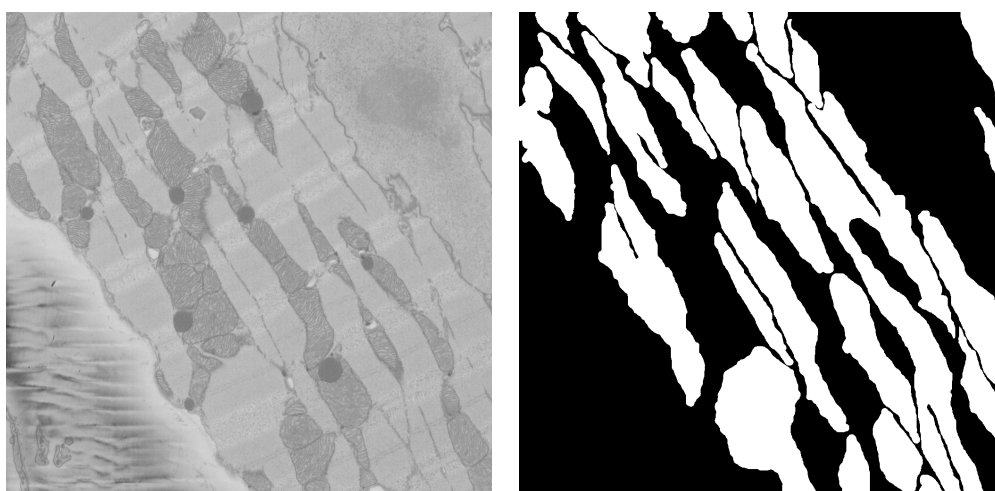


図 3.7 強度調節後の細胞 A の入力画像(左)、正解ラベル(右)

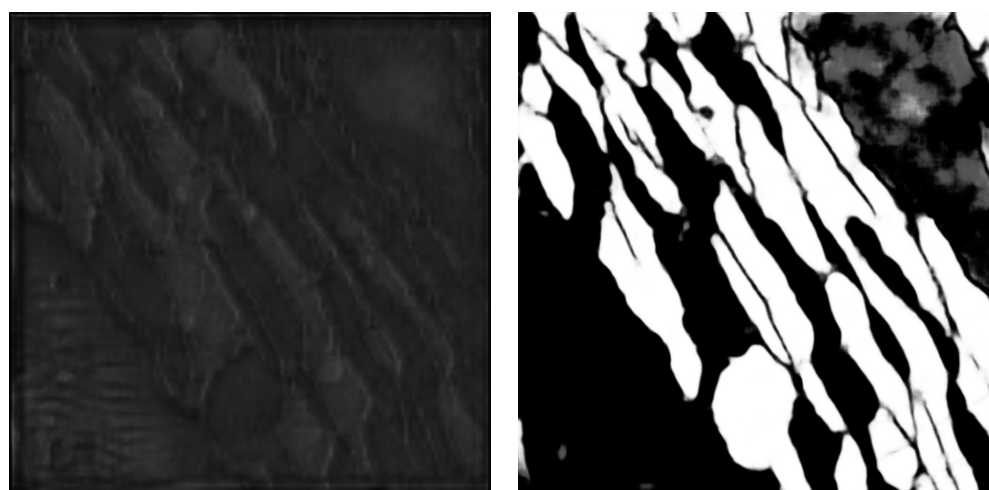


図 3.8 強度調節前の入力画像をセグメントした結果(左)

強度調節後の入力画像をセグメントした結果(右)

まず図3.1と図3.7の細胞Aの画像を比べると強度調節を行うことによって明るくなっていることがわかる。図3.8左のデータセットにのみ画像調節を行った場合は、ほぼ真っ黒で筋

原線維の部分がかりうじて灰色になっている程度の精度であることが目視で確認できる。一方図3.8右の入力画像にも強度調節を行った場合は、正解ラベルと比べると目視の範囲でかなり高い精度で抽出できていることがわかる。(a)強度調節を行わなかった場合、(b)データセットの画像に強度調節を行った場合、(c)入力画像にも強度調節を行った場合の3通りでの適合率、再現率、F値を表3.4に示す。

表 3.4 F 値最大しきい値での各指標の値

	適合率	再現率	F値
(a)(しきい値57)	0.4403	0.8996	0.583
(b)(しきい値1)	0.4175	0.9997	0.5807
(c)(しきい値130)	0.9584	0.9586	0.9584

セグメンテーション結果をF値が最大になるしきい値で二値化した結果を図3.9に示す。ただし図3.8の左のセグメンテーション結果をしきい値1で二値化すると白の画像になるためここでは示さない。



図 3.9 強度調節後の入力画像をセグメントした結果の二値化画像

データセットの画像にのみ強度調節を行った場合の各指標の値は先行研究と比べると、適合率は50%、再現率は3%、F値は37%の差がある。再現率は先行研究より大きい値になっているが、これはセグメンテーション結果の二値化が白であるため、偽陰性が非常に少なくほとんど存在しない。その結果として再現率が100%に近く先行研究よりも高くなったと考えられる。一方で偽陽性が多いため適合率は低くなり先行研究の50%以下となっている。

入力画像にも強度調節を行った場合の各指標の値は先行研究と比べると、適合率は4%、再現率は1%、F値は1%の差がある。適合率、F値は先行研究より大きい値になっている。図3.9のセグメンテーション結果の画像と図3.7の正解ラベルを比べると、画像の右上と左

下で多少の誤抽出がみられるが、各指標の値の差はいずれも5%以内となっており抽出の精度が高いことがわかる。

強度調節を行わずに全30組のデータセットを用いた場合、データセットにのみ強度調節を行った場合、入力画像にも強度調節を行った場合で比べると、データセットに限定せず入力画像に対しても強度調節を行うことで精度が大きく向上していることがわかる。これは前に述べたように強度調節によって、細胞Aと細胞Bの画像の撮影環境の差が抑えられているからだと考えられる。一方で興味深いのは図3.2の右の画像と図3.8の左の画像を比べると、目視の範囲でデータセットにのみ強度調節を行った場合の方が、何もせずに30組のデータセットを用いた場合よりかえって精度が低くなっているようにみえるということだ。図3.8の左の画像を二値化すると画像一面白になってしまうために再現率が100%近くなる、ということを考慮して再現率を無視すると、適合率は2%、F値は0.2%の差がある。指標上は目視で確認できるほどの精度の差はみられない。このことは目視での感覚を指標の値が保証せず、必ずしも指標が抽出の精度を表していないということだと考えられる。また目視での抽出精度が低いと思われる場合ほどその傾向は強いと考えられる。図3.8の左の画像のようにセグメンテーションの結果の二値化画像が一面白であれば、再現率が高く計算される上に、適合率との調和平均で計算されるF値も高く計算される。結局図3.2の右の画像と図3.8の左の画像を比べたときに、適合率、F値としては微笑な差であるが、どうしても目視で同じ精度であるとは考えられない。原因は強度調節後の画像の撮影環境に対して全30組のデータセットで深層学習を行ったため、強度調節後の環境において強く、正確な抽出ができるようになったからであると考えられる。その状態においては強度調節前の入力画像に対して精度良く抽出できないのは当然であろう。

細胞Bをセグメントした結果の一例を図3.10、図3.11に示す。図3.10は細胞Aの強度調節後の入力画像と正解ラベル、図3.11は左が強度調節前の細胞Bの画像をセグメントした結果、右が強度調節後の細胞Bの画像をセグメントした結果である。

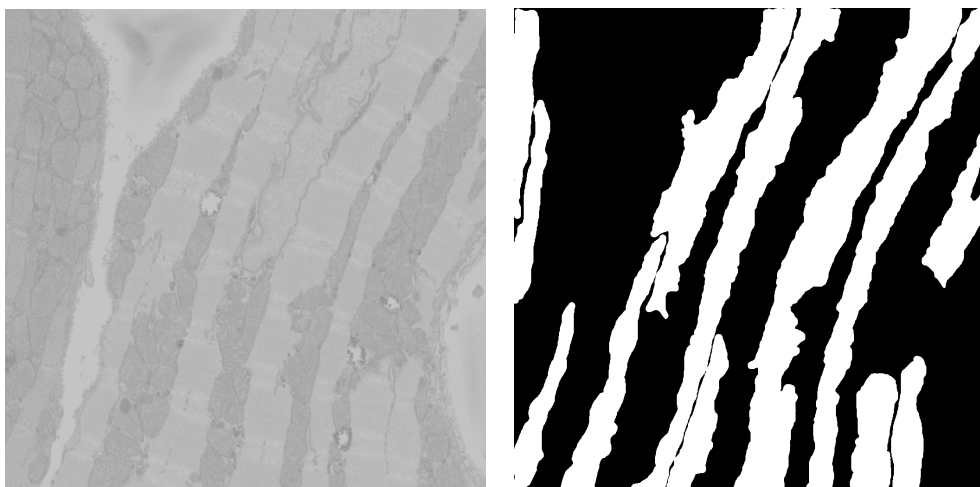


図 3.10 強度調節後の細胞 B の入力画像(左)、正解ラベル(右)

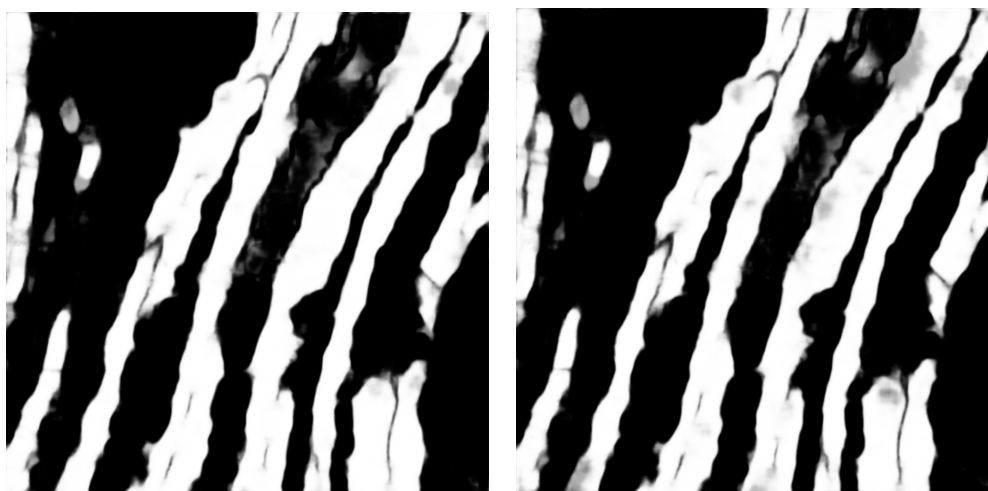


図 3.11 強度調節前の入力画像をセグメントした結果(左)

強度調節後の入力画像をセグメントした結果(右)

図3.10の右の正解ラベルと比較すると、図3.11の両画像とも目視の範囲で高い精度で抽出できていることがわかる。(a)強度調節を行わなかった場合、(b)データセットの画像に強度調節を行った場合、(c)入力画像にも強度調節を行った場合の3通りでの適合率、再現率、F値を表3.5に示す。

表 3.5 F 値最大しきい値での各指標の値

	適合率	再現率	F値
(a)(しきい値)	0.7194	0.8473	0.7761
(b)(しきい値139)	0.9006	0.9436	0.9215
(c)(しきい値129)	0.8990	0.9444	0.9210

セグメンテーション結果をF値が最大になるしきい値で二値化した結果を図3.12に示す。



図 3.12 強度調節前の入力画像をセグメントした結果の二値化画像(左)

強度調節後の入力画像をセグメントした結果の二値化画像(右)

各指標を先行研究と比較すると、データセットにのみ強度調節を行った場合と入力画像にも強度調節を行った場合の両者において、適合率は2%、再現率は2%、F値は3%の差となっている。いずれの指標においても差は5%未満となっており、両者とも高い精度で抽出できていることがわかる。

強度調節を行わず全30組のデータセットを用いて抽出した場合と両者を比べると、強度調節を行うことで抽出の精度が大きく向上していることがわかる。一方でデータセットにのみ強度調節を行った場合と入力画像にも強度調節を行った場合を比べると、適合率、再現率、F値のいずれも差は1%未満となっている。細胞Aにおいては、データセットのみならず入力画像にまで強度調節を行うことで初めて精度が大きく向上したが、細胞Bにおいてはその傾向はみられず、データセットに強度調節を行った段階で精度が向上した。原因は強度調節が細胞A、細胞Bそれぞれの元の画像に与える影響の差によるものだと考えられる。細胞Aの強度調節前と強度調節後の画像を図3.13、強度分布を図3.14に示す。同様に細胞Bの強度調節前と強度調節後の画像を図3.15、強度分布を図3.16に示す。

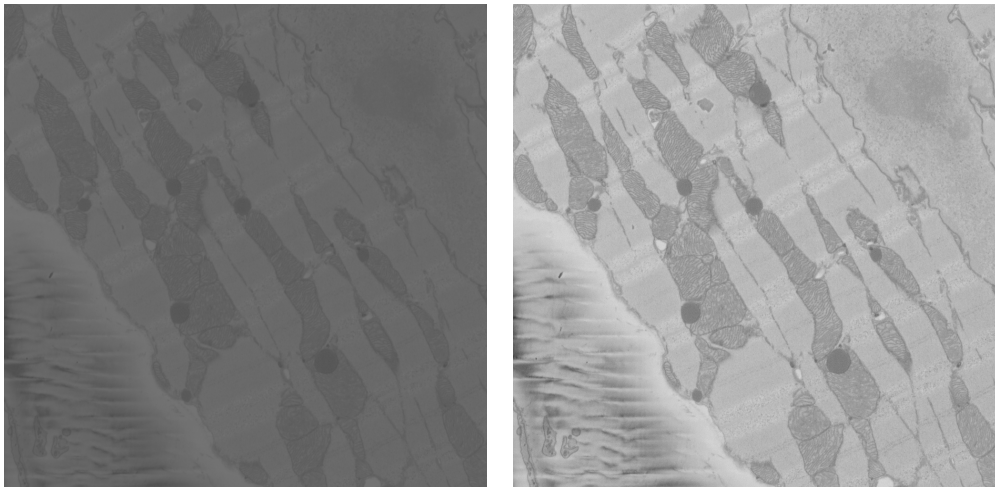


図 3.13 細胞 A の入力画像
強度調節前(左)と強度調節後(右)

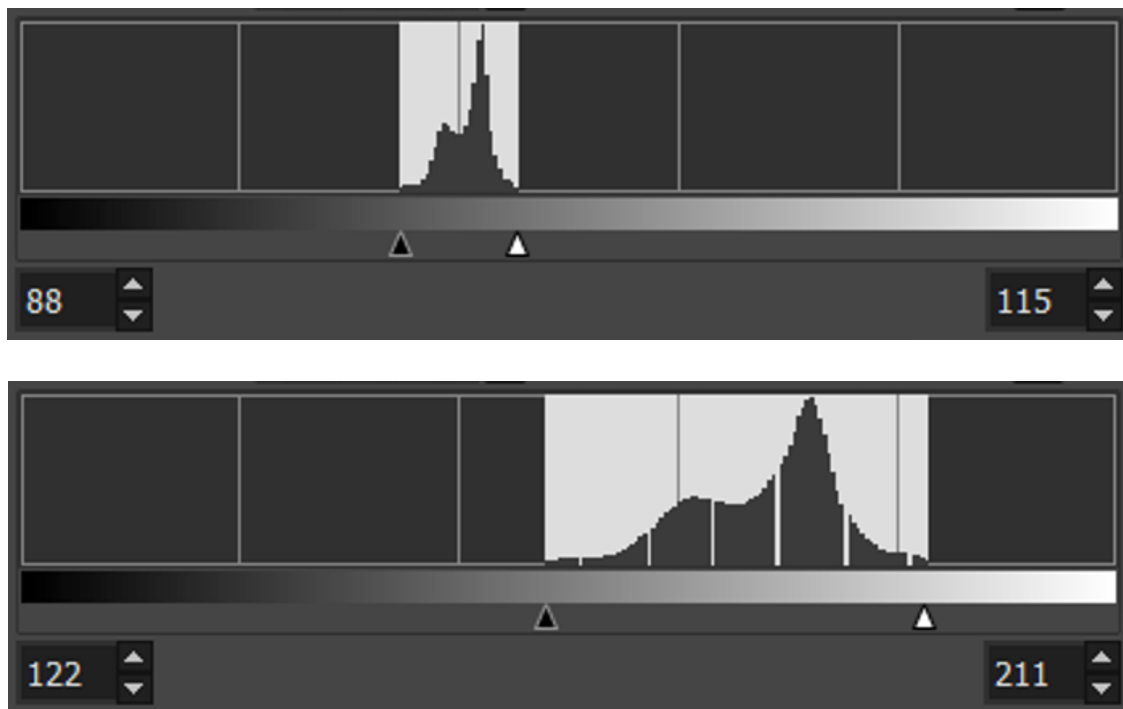


図 3.14 細胞 A の画像の強度分布
強度調節前(上)と強度調節後(下)

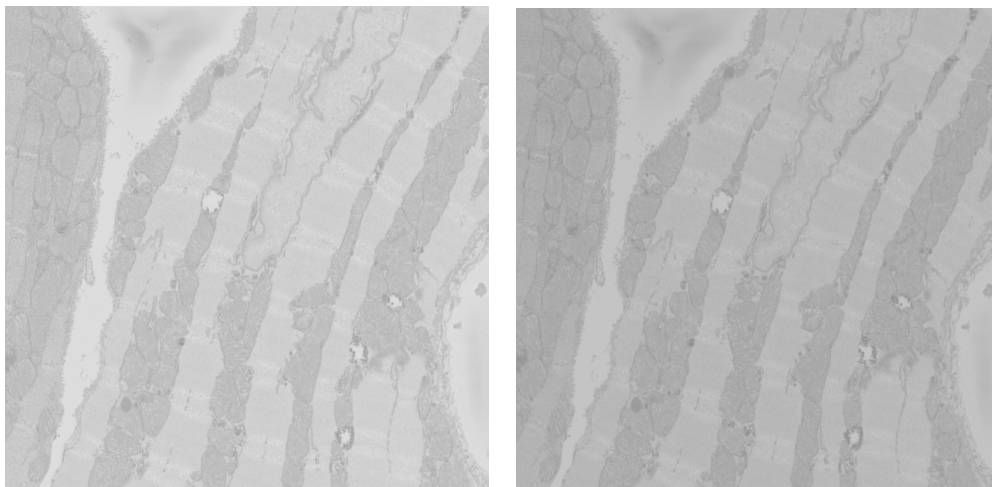


図 3.15 細胞 B の入力画像
強度調節前(左)と強度調節後(右)

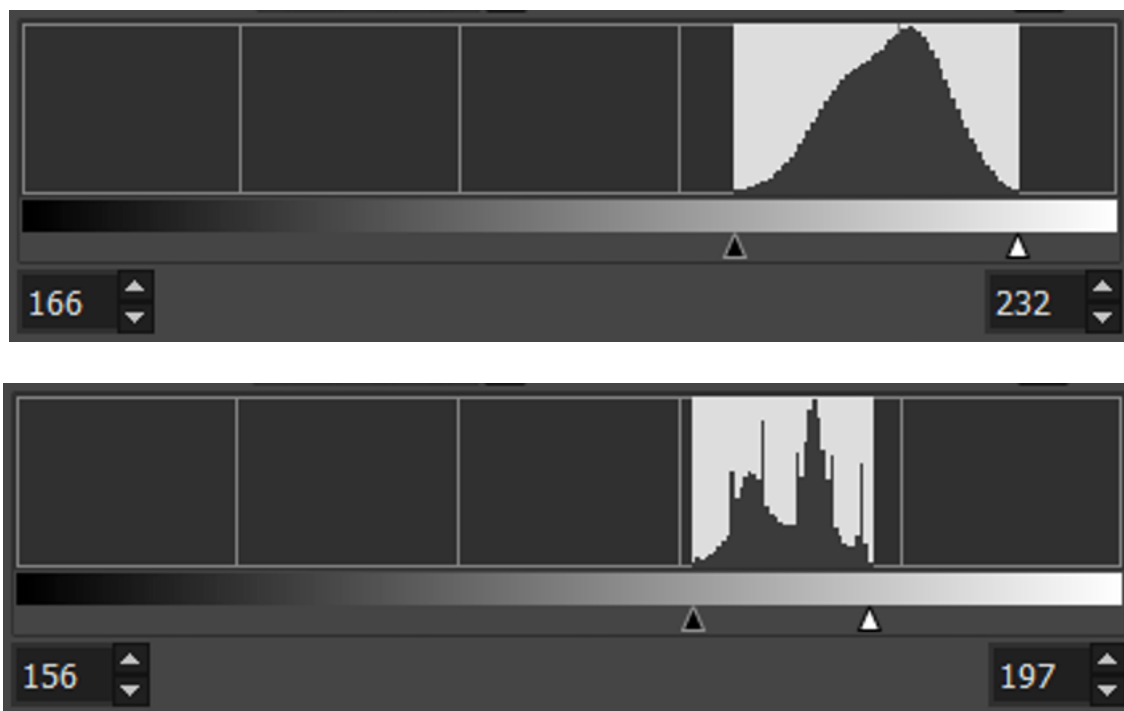


図 3.16 細胞 B の画像の強度分布
強度調節前(上)と強度調節後(下)

強度調節を行うことで、図3.14からわかるように細胞Aの強度分布は88~115から122~211に、図3.16からわかるように細胞Bの強度分布は166~232から156~197になっている。視覚的にも、また強度分布の変化からも強度調節が元の細胞Aの画像に与える影響の方が、細胞Bの画像に与える影響より大きいと考えられる。図3.15、16はあくまで結果画像の一例に過ぎず、細胞Bにおいて目視の範囲で抽出の精度が向上している例もある。強

度調節前と強度調節後の細胞Bの入力画像を図3.17、セグメンテーション結果を図3.18に示す。

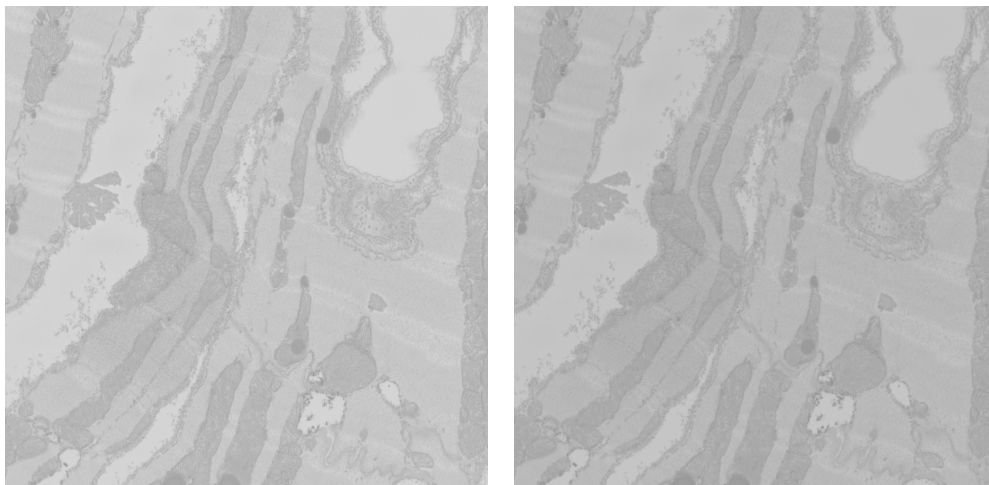


図 3.17 細胞 B の入力画像
強度調節前(左)と強度調節後(右)

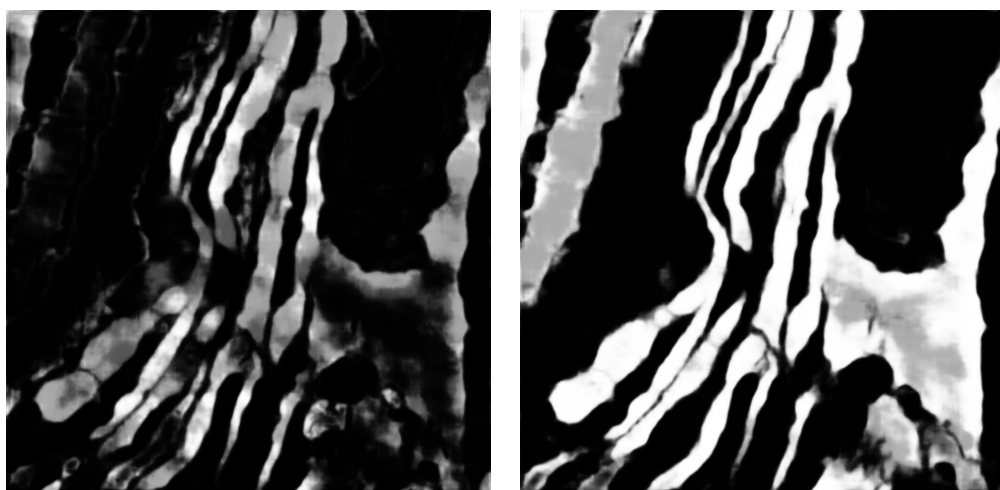


図 3.18 強度調節前の入力画像をセグメントした結果(左)
強度調節後の入力画像をセグメントした結果(右)

図3.18の左右の画像を比較すると、強度調節前の入力画像をセグメントした場合には、筋原線維がぼんやりと灰色で抽出されているのに対し、強度調節後の入力画像をセグメントした場合には、はっきりとした白色で筋原線維が抽出されていることがわかる。正解ラベルを作成していないため、適合率、再現率、F値を計算して比較することはできないが、目視の範囲で抽出の精度がかなり向上している。

細胞Aと細胞Bで差はあったが、データセットと入力画像に強度調節を行うことで抽出の精度が向上することがわかった。細胞Aと細胞Bの撮影環境が異なったため、強度調節を行

わないでデータセットを15組増やしても汎用性が上がらず、細胞Bに関しては逆に精度が落ちてしまった。強度調節を行うことで撮影環境の差を抑えられたために汎用性が向上し、細胞Aに対しても細胞Bに対しても高い精度で抽出できたと考えられる。

3.3 分割処理後の結果

分割処理の結果の一例を図 3.19、20、21 に示す。それぞれ左が入力画像で右が分割処理の結果である。なお、分割処理は細胞 B に対して行った。

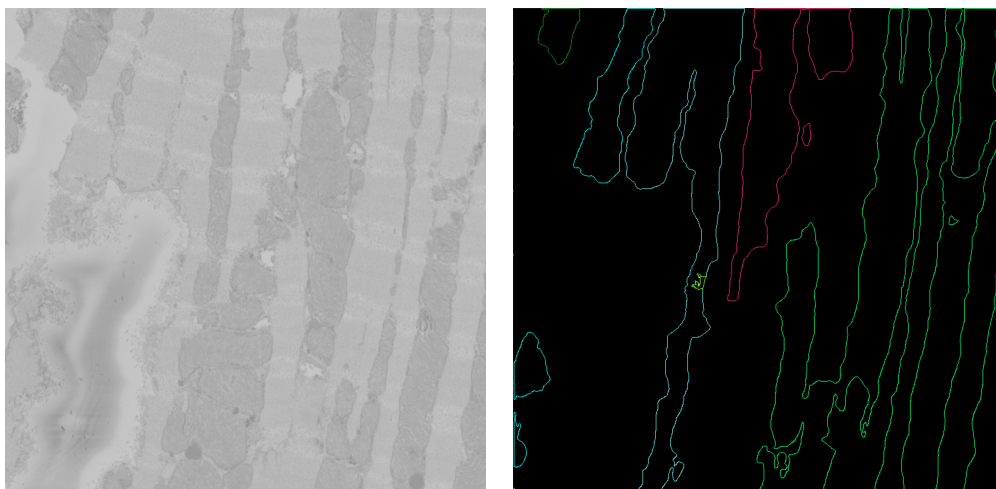


図 3.19 入力画像(左)と分割処理結果(右)

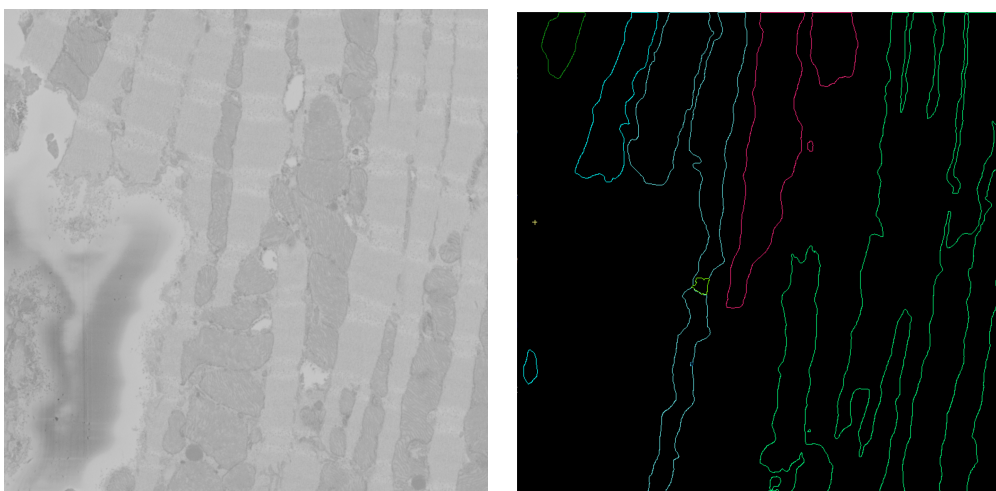


図 3.20 入力画像(左)と分割処理結果(右)

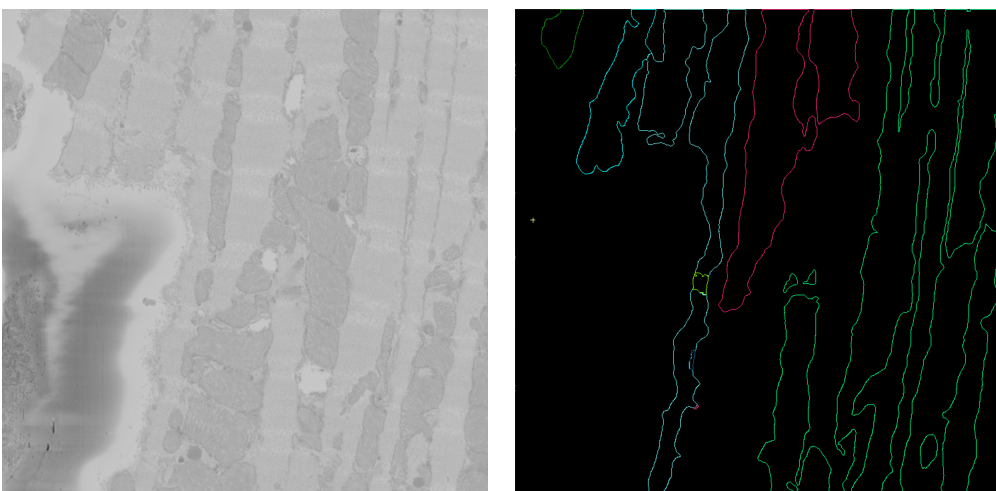


図 3.21 入力画像(左)と分割処理結果(右)

深層学習の際には白で筋原線維を抽出したのに対し、分割処理によって一つ一つの筋原線維が異なる色で抽出、すなわち異なる筋原線維として抽出されていることがわかる。

図 3.19、20、21 は連続する 3 枚の画像である。ここで緑色の線で囲まれた筋原線維に注目する。少しわかりにくいですが、図 3.19 では完全に分断されていた部分が、図 3.20 では急に一体となり、図 3.21 では分断していないが割れ目が入っており図 3.19 に近い分割になっている。しかしそれぞれの左の入力画像をみると、Z 帯がずれていることから図 3.19 のように完全に分断されている、と考えるほうが適当である。では図 3.20 ではなぜ急につながり一体となってしまったのか。これは分割処理の際に定めた輪郭のしきい値が適当でなかったからだと考えられる。図 3.19~21 の分割処理結果から輪郭のしきい値をより小さくし、輪郭をよりはっきりと表現する必要があると考えられる。そこでもう一つの分割処理結果の一例を図 3.22 に示す。同様に左が入力画像、右が分割処理結果である。

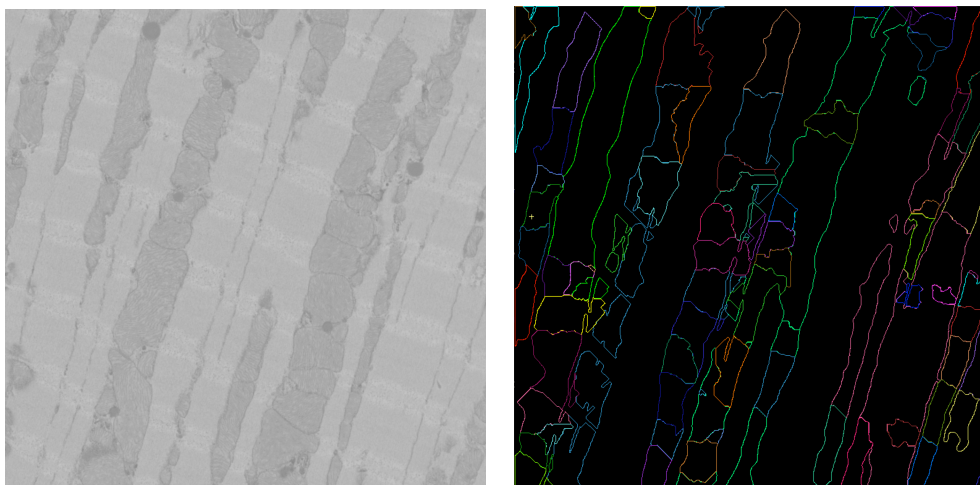


図 3.22 入力画像(左)と分割処理結果(右)

図 3.22 の分割処理結果をみると明らかに分割しすぎであることがわかる。左右の画像をよく見比べると Z 帯の部分境界として分割してしまっている部分が多い。これも当然輪郭のしきい値が適切でないことが原因であると考えられる。しかし図 3.22 の場合は図 3.20 の場合とは逆に輪郭のしきい値をより大きくする必要があると考えられる。分割処理の際、中身、輪郭、差分の 3 つのしきい値を定める必要があるが、しきい値はそれぞれの画像に対して定めるのではなく全ての画像に対し一括で定めている。そのためさきほど述べたようにあるスライスをみればしきい値を小さくしたい、他のスライスではしきい値を大きくしたいということが起きる。このような問題が起きる原因はしきい値の設定を目視によって行っているからだと考えられる。深層学習によるセグメンテーションの際にはしきい値を順に変化させ、F 値が最大になるしきい値を評価に用いた。同様のことが分割処理においてもできることが理想的である。つまりしきい値を順に変化させ、各画像におけ

る分割の精度がどのように変化するかを観察し、自動的に細胞画像全体として最適なしきい値を導き出すということだ。そうすればより体系的に分割処理をすることができ、撮影環境などが異なる細胞に対しても高い精度で抽出できる。

3D モデルにおいて筋原線維の個数、体積、平均体積、体積率を表 3.6 に示す。

表 3.6 筋原線維の個数、体積、平均体積、体積率

撮影範囲 (μm^3)	細胞外体積 (μm^3)	個数	体積 (μm^3)	体積率(%) (撮影範囲)	体積率(%) (細胞外除く)
9.897×10^3	2.868×10^3	1402	3.04×10^3	30.58	43.07

背景で述べたように筋原線維の体積率は 50~60%なので、細胞外体積を除かないと 20~30%、細胞体積を除くと 7~17%とりこぼしていることがわかる。原因の一つとしては深層学習における対象の抽出においてとりこぼしがあるというのが考えられる。どれほど筋原線維のとりこぼしがあるかを示す適合率が、田中の先行研究に比べて 2%程度低いことからわかる。深層学習によるセグメンテーション結果の一例を図 3.23 に示す。

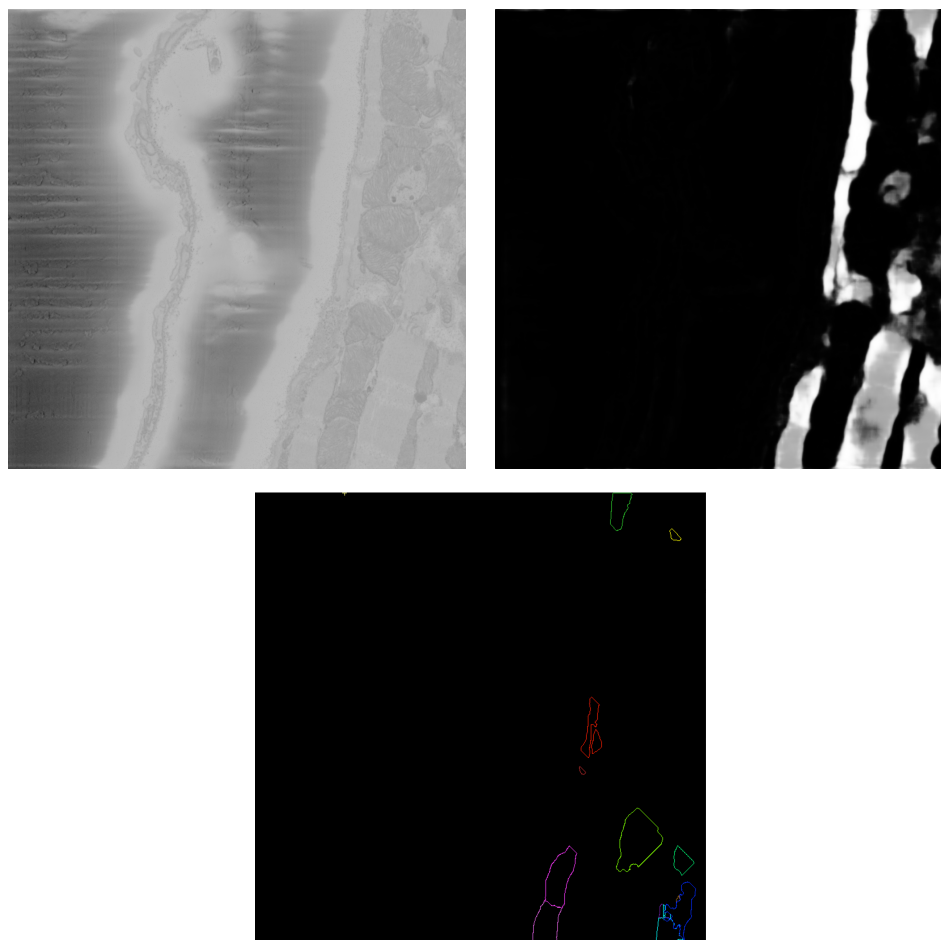


図 3.23 入力画像(左)、セグメンテーション結果(右)、分割処理結果(中央)

セグメンテーション結果をみるとぼんやりと抽出できている程度ではっきりとした白で抽出できていない。そのため分割処理を行った結果においてとりこぼしがあることがわかる。全 690 枚の SEM 画像からなる細胞 B において、図 3.23 のようにぼんやりとしたセグメンテーション結果が約 100 枚続いている。そして個々の画像に差はあるが、100 枚の部分では分割処理結果もとりこぼしが目立つ。図 3.23 の入力画像も一例だが、このあたりの 100 枚の画像において黒い面積、すなわち細胞外の部分が広く画像の大部分を占めている。細胞外の黒い部分によってセグメンテーションの精度が若干落ちる可能性がある。あらかじめ細胞外の部分を除き、残った細胞内の部分についてセグメンテーション、分割処理を行えるような仕組みが理想的である。

分割処理において、とりこぼしがあった原因としてもう一つ考えられるのは、さきほども述べたようにしきい値の設定が不適切であったということである。例えば輪郭のしきい値が小さく白い部分が大きくなると、筋原線維と筋原線維の境界部分が大きな輪郭として認識され、筋原線維と筋原線維の間が大きめに取られてしまい、結果として体積も小さくなってしまう。この点についても、目視ではなく適切な精度を自動的に設定できればよいと考えられる。

4 結言

4.1 結論

深層学習を用いることで筋原線維を抽出できることを確認した。一つの細胞の筋原線維を抽出するためには、抽出したい細胞のデータセット 15 組程度で F 値は 90%以上と高い精度で抽出できた。

一方で異なる細胞にも対応する上で、細胞間の撮影環境の差を抑えるため、データセット画像と入力画像に強度調節を行うことが効果的であることを確認した。

分割処理によって作成した 3D モデルは筋原線維の取りこぼしがあり、しきい値の設定を目視により行うのは適切ではないということがわかった。また細胞外の部分がセグメンテーション結果に悪影響を与える可能性がある。

4.2 課題と展望

まず分割処理において、しきい値の設定を目視によって行わなければならないというのが現状の課題である。深層学習において F 値などの指標を用いることで、抽出の精度について絶対的ではないがある程度定量的に議論することができた。そしてしきい値を変化させながら各指標を計算し、最適なしきい値を自動的に設定することができた。分割処理においても精度を定量的に評価し、適なしきい値を自動で設定できれば分割の精度や汎用性が上がると考えられる。当然手間が省け、効率化できることは言うまでもない。

本研究では筋原線維の 3D モデルを作成し、モデルの妥当性を個数、体積などの簡単な要素から判断した。上記の点のみならず、筋原線維の太さや線維方向、Z 帯の情報なども分割処理後に取得できるようになるとより正確に 3D モデルの妥当性を検証できる。また、線維方向や Z 帯の情報はミトコンドリアや T 管の形態を評価する際にも有用な情報である。つまり心筋細胞全体のモデルの作成、シミュレーションにより、心疾患による心筋細胞の形態の変化と心臓の能力低下の因果関係について考察する、という大きな目的を達成する上でも線維方向や Z 帯の情報は重要であると考えられる。

謝辞

本研究は多くの方のご指導、ご協力によって行われました。

まず、終始適切な助言、熱心なご指導を頂いた指導教員の波田野明日可講師に感謝の意を表します。特に初めての研究室での研究、加えてコロナ禍という慣れない環境の中でも常に研究の方向性を示して頂き、安心して納得しながら研究に励むことができました。また泉聡志教授、榊間大輝助教にも研究の環境を整えて頂きました。感謝申し上げます。

本研究のデータの元となる心筋細胞電子顕微鏡画像を提供して頂いたカリフォルニア大学サンディエゴ校の星島様に感謝の意を表します。

本研究室の先輩方にもたくさんのご指導を頂きました。特に染谷さんには大変お世話になりました。ソフトの使い方やプログラミングについてなどたくさんのことを教えて頂き、また何度も研究方針について相談に乗って頂きました。感謝申し上げます。

最後に、同学年として共に研究した同期、今まで私を支えてくださった両親に感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

参考文献

- [1] E. A. Rog-Zielinska, E. T. O'Toole, A. Hoenger, and P. Kohl, "Mitochondrial Deformation During the Cardiac Mechanical Cycle," *Anat. Rec.*, vol. 302, no. 1, pp. 146–152, 2019.
- [2] Shouryadiptra Ghosh et al., "Insights on the impact of mitochondria organisation on bioenergetics in high-resolution computational models of cardiac cell architecture.", *PLoS Comput Biol* 14(12) : e1006640, 2018
- [3] A. Hussain *et al.*, "An automated workflow for segmenting single adult cardiac cells from large volume serial block-face scanning electron microscopy data." *Journal of Structural Biology*, vol 202, pp. 275–285, 2018.
- [4] 田中宏明, "心筋細胞画像からの実計上モデル自動作成手法の開発," 東京大学, 2019
- [5] 染谷誠, "心筋細胞電子顕微鏡画像に基づく微細構造モデルの作成手法の開発," 東京大学 2020
- [6] 波田野明日可, "心筋細胞の微細構造を考慮した電気生理・代謝・力学統合マルチフィジックスシミュレーション," 東京大学, 2012.
- [7] M. G. Haberl *et al.*, "CDeep3M—Plug-and-Play cloud-based deep learning for image segmentation," *Nat. Methods*, vol. 15, no. 9, pp. 677–680, 2018.

以上

卒業論文

心筋細胞電子顕微鏡画像に基づく
機械学習を用いた筋原線維モデルの作成

2021 年 1 月 29 日

指導教員 波田野 明日可 講師

03-190182 小沢 宏輔