卒業論文

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

2020年 1月 30日提出

指導教員 波田野 明日可 講師 💮

03-180200 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

03180200 染谷 誠 指導教員:波田野 明日可 講師 Keywords: Cardiac ultrastructure, Image segmentation, Deep learning, Intensity, Serial-block-face image

1. 緒言

今日の医学分野において未解明の病気や現象は数多く存在し,解明に向けた新手法の開発が強く求められている. その一つとして,近年大きく発達しているシミュレーション技術が挙げられる.特に心筋細胞微細構造の形態と心疾患との因果関係は未解明な現象の一つであり,心筋細胞の3Dモデルを作成してシミュレーションを行うことでメカニズムを解明できる可能性があるため,微細構造の3Dモデル作成の手法が研究されている.しかし,小器官を多数手書き抽出する必要があり非常に手間がかかるため,広くデータをとることについてはあまり行われてこなかった.

田中[1]はミトコンドリアを手書きで抽出した画像50枚を 教師画像として深層学習を用いて 400 枚の画像のセグメン テーションを行い,画像処理により 3D モデルを作成する手 法を開発している.これにより少ない作業量で広範囲のモ デリングを可能としているが,未知の異なる画像に対する 高い精度での抽出がない点で汎用性に欠くと言える.

そこで、本研究では田中の深層学習モデルを改良して精 度の維持及び汎用性の向上を図ることを目的とする.

2. 微細構造モデルの作成

学習は AWS 上の CDeep3M[2]を使用し転移学習を用いる. 田中が扱った心筋細胞とは異なる細胞の画像から作成した 20 枚の教師データを田中の教師データ 50 枚に5 枚ずつ追加 し学習モデルを作成,それぞれのセグメンテーション結果 と追加枚数との関係性を求める.その際の評価指標にはピ クセルごとに以下の表1に基づいて分類した後に式2.1,2.2, 2.3 の適合率,再現率,F値を使用する.

	ラベルが正	ラベルが負
出力が正	真陽性:TP	偽陽性:FP
出力が負	偽陰性:FN	真陰性:TN
適合	译率 = TP/(TP+F	P) (2.1)
再現	l = TP/(TP + F)	N) (2.2)

Table 1	1:	Pixel	-based	result	classif	ication
----------------	----	-------	--------	--------	---------	---------

F値 = 2TP/(2TP + FP + FN) (2.3) その後,田中の画像処理による個体の分割処理を用いて セグメンテーション結果から3Dモデルを作成し、ミトコン ドリアの個数,体積、ミトコンドリアを長球に近似した際の 離心率及び筋原線維方向に対する主軸の配向度を算出し E.Rog-Zielinska[3]らの手書き抽出によるデータ及び田中の データと比較する.

また、セグメンテーション前の入力画像の強度分布を教 師に用いた画像の平均強度分布に近づくよう調節し精度の 変化を確認する.

3. 結果と考察

3.1 深層学習モデルの比較

追加データ数と精度との関係性は図 3.1 の通りになった.15 組の追加で F 値が大きく増加,20 組で F 値は 0.922 となった. 田中の F 値は 0.948 であるので,追加数 20 組で同程度の抽出ができている.



Figure 3.1 Effect of the number of additional data sets 3D モデルの比較については、個体数、体積、離心率は田中 のモデル、本研究のモデルともに手書き抽出によるデータ [3]に概ね一致していた.配向性については、本来筋原線維の 向きとなす角度が 0 度に近い個体が多くを占めるはずが 60-90 度をなす個体が少なくなく存在した.このことから長 球状のミトコンドリアが分断されていることが考えられる.

3.2 入力画像の強度調節

強度調節により図 3.2 の通りミトコンドリアが高い確率 で抽出できている. ラベルのあるスライスで調節前後の精 度を比較してもわずかではあるが向上していた.



Figure 3.2 Segmentation result before (left) and after (right) strength adjustment

一方で、ミトコンドリアと筋原線維に強度の差がない場合はまとめて抽出するために精度が落ちる結果となった. 撮影環境の重要性がかなり高いことが伺える.

4. 結論

大きなモデルの作成を可能とするミトコンドリアの自動抽出手法の精度及び汎用性をF値,体積,離心率,配向性の観点から確認し,分割精度を高めることで3次元モデル作成に有用となることを確認した.

また強度の調節は精度の向上に有効ではあるが、ミトコ ンドリアと筋原線維の強度が分かれているという前提がな い場合ミトコンドリア単体での抽出は困難になった.

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] 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.

[3] 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.

日次	

目次

1 序	論		.8
1.1	研究	宅の背景	9
1.1	1.1	医療とシミュレーションの可能性	9
1.1	.2	心筋細胞と心疾患	9
1.2	過去	ちの研究	10
1.2	2.1	小器官の形状の分析	10
1.2	2.2	強度分布を利用した小器官抽出	10
1.2	2.3	心筋細胞の 3D モデル構築及び小器官抽出の自動化	11
1.3	研究	光の目的	12
1.4	本請	倫文の構成	12
2 深	層学習	習による微細構造モデルの作成	13
2.1	心角	5細胞の微細構造	14
2.1	1.1	心筋細胞の微細構造	14
2.1	.2	SBF-SEM	15
2.2	深層	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	16
2.2	2.1	深層学習概要	16
2.2	2.2	深層学習を用いたセグメンテーション	19
2.2	2.3	CDeep3M	19
2.3	小者	器官抽出処理	20
2.3	3.1	教師データの作成	20
2.3	3.2	入力イメージ画像の強度調節	21
2.3	3.3	深層学習による小器官抽出	23
2.3	3.4	個体の分割処理	24
2.4	評估	西方法	25
2.4	4.1	小器官抽出結果の分類	25
2.4	1.2	評価指標	26
2.4	1.3	しきい値の設定	27
2.4	1.4	_ 個体分割の評価	28
3 結:	果とネ		31
3.1	深層		32
3.1	1.1	セグメンテーション結果の比較	32
3.1	.2	分割処理後の比較	36
3.2	入フ	り画像の強度調節	39
4 結	言	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	43
4.1	結論		44
4.2	今後	後の課題と展望	44
謝辞	······		45
参考文	献		16

図目次

図 1.1	正常な心筋細胞の微細構造の電子顕微鏡写真(左), 心疾患を患った心筋細胞微
細	構造の電子顕微鏡写真(右)9
図 1.2	手法の概要12
図 2.1	心筋細胞模式図[6]15
図 2.2	ニューラルネットワーク(NN)概略図16
図 2.3	畳み込み演算18
図 2.4	Max プーリング18
図 2.5	dropput の概念図[9]19
図 2.6	CDeep3Mの画像セグメンテーションのワークフロー[10]20
図 2.7	手書きで作成したミトコンドリアのデータセットの1例 学習用SEM画像(左),
ラ	ベル画像(右)
図 2.8	強度分布の一例 心筋細胞画像(左)とその強度分布(右)
図 2.9	強度調節例 調節前(左), 調節後(右)
図 2.10) 強度分布表 調節前(左), 調節後(右)
図 2.11	大まかな分割画像24
図 2.12	2 ガウスぼかし(左),2値化(中),核の識別(右)25
図 2.13	3 手書きラベル(左), 2次元分割画像(中), 3次元分割画像(右)25
図 2.14	・ セグメンテーション結果の分類の例
図 2.15	5 しきい値による精度変化のイメージ
図 2.16	5 長球
図 2.17	7 主軸回転イメージ
図 3.1	入力画像(左), 正解ラベル(右)
図 3.2	セグメンテーション結果 順に追加データセット数0組,5組,10組,15組,20組
図 3.3	先行研究の予測結果[5]34
図 3.4	二值化画像
図 3.5	追加データセットと F 値の関係
図 3.6	しきい値による評価指標の変化
図 3.7	入力画像(左), 分割処理結果(右)
図 3.8	離心率の比較
図 3.9	配向性の比較
図 3.10) 強度調節後の入力画像(左), 正解ラベル(右)
図 3.11	セグメンテーション結果 強度調節前(左), 強度調節後(右)40
図 3.12	2 入力画像40
図 3.13	。 セグメンテーション結果 強度調節前(左), 強度調節後(右)41

図 3.14	強度が分かれていない入力画像(左),	強度分布(右)42
図 3.15	筋原線維がセグメント されている例	i]42
図 3.16	筋原線維の確率が低い セグメンテー	-ション結果42

表目次

表 1	結果の分類	
表 2	F 値最大点での精度	
表 3	ミトコンドリアの個体数,平均体積,	体積率
表 4	強度調節前後での精度	

	1			
	T	/丁 山田		

1 序論

8

1.1 研究の背景

1.1.1 医療とシミュレーションの可能性

今日までの医療は主として専門家の医学的な知識と経験及び統計的手法によって発展し てきたが、メカニズムが解明されていない病気や現象は未だ数多く存在する.そのため、こ の未解明の現象を解明する新しい手法の開発が求められている.新しく検討されている手 法の1つが「シミュレーション」による手法である.近年ではシミュレーション技術の高精 度化から製品の検証を実験の代わりにシミュレーションで行うなど、実用化が進んでいる. さらに、災害の被害予測といった実測できない現象の解明や予測などについても、シミュレ ーションによって新たな知見を得ることができた例が数多く存在する.このシミュレーシ ョン技術を医療にも取り入れ、ヒトをモデル化して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手法の効果予測を実現できる可能性がある.

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、心筋細胞の働きにより心臓全体が収縮し全身に血液が送り出されている.正常な心筋細胞と心疾患を患った心筋細胞の微細構造を図1.1 に示す.正常な心筋細胞では小器官が列状に並んで配置しているのに対して、心疾患を患った心筋細胞では小器官が特定の箇所に凝集しており向きも一様ではなく、正常な心筋細胞と比べると不規則な配置となっていることが視覚的にわかる.一般に心筋梗塞などの心疾患を患った心筋細胞は、形態が乱れていること、生理的・力学的機能が低下していることが知られている[1].しかし、この心筋細胞微細構造の形態変化と機能低下との因果関係は未だ解明されていない.心筋細胞の3Dモデルを作成してシミュレーションを行うことでこの因果関係のメカニズムを解明できる可能性が高く、今後の治療予防及び心臓医療の発展へとつながる重要な課題である.



図 1.1 正常な心筋細胞の微細構造の電子顕微鏡写真(左), 心疾患を患った心筋細胞微細構造の電子顕微鏡写真(右)

1.2 過去の研究

1.2.1 小器官の形状の分析

心筋細胞の小器官の形状に関する先行研究は数多くある.

E.Rog-Zielinska[2]は,拘縮,弛緩,伸長の3つの力学状態下における心筋細胞内のミトコ ンドリアを電子顕微鏡画像から輪郭を手書きで抽出して力学状態と形状との相関性や小器 官同士の相互作用について分析している.サルコメア長が大きくなるとミトコンドリアは 筋節方向に伸長し凸多面体から長楕円体に変化していることや,機能上重要とされている ミトコンドリア同士の結合と分離の様子,横行小管や筋小胞体といった他の小器官と密接 な空間的相互関係を持つことが手書き抽出からわかっている.

C.Kong[3]は, 蛍光顕微鏡による観測から表面積と内部体積を測定し, その関係性から T 管の形状に適切な幾何モデルをフィッティングすることで T 管の形状を抽出し管の直径, 体積, 配向性を測定した. この手法は回折限界をはるかに下回る大きさをもつ物体の光学顕 微鏡による非破壊的な測定を可能としている. ウサギやマウスの測定結果が高圧凍結試料 のごく狭い範囲での電子顕微鏡画像の測定値と一致しているのを確認している.

小器官の形状の分析は様々な研究で行われているが、手書きによる抽出を多数行う必要 があり手間がかかるため、広くデータをとるということは難しくあまり行われていない.

1.2.2 強度分布を利用した小器官抽出

小器官の抽出を手書きで行うと非常に手間と時間を要するため、大きなモデルを作成す るのはほとんど不可能といえる.それを解消したのが A.Hussain[4]の手法である.試料表面 の切削と電子顕微鏡による撮影を繰り返すことで試料の断面を連続的に撮影し(SBF-SEM), 10 枚おきに手書きで小器官のセグメンテーションを行う.画像内ピクセルの強度分布を作 成し、セグメンテーション結果と合わせて小器官を判別、全ての画像についてもセグメンテ ーションを行うというものである.セグメンテーション結果は次の図 1.3 の通りである.



図 1.2 入力画像(左)と強度分布に基づくセグメンテーション結果(右)

概ね精度よく抽出できているが, 誤認識されている箇所も確認される. 少ない作業量での 抽出を可能とするが, 小器官ごとに強度分布がはっきり分かれていることを前提とした手 法であるといえる. また小器官を群としては抽出できているが, 個々に抽出するところまで は行われていない.

1.2.3 心筋細胞の 3D モデル構築及び小器官抽出の自動化

解析に使用可能な心筋細胞の 3D モデルを作成した例の一つが田中[5]である. 細胞内の小 器官をすべて手書きで抽出してその輪郭情報からメッシュ作成ソフトでモデル化・メッシ ングを行っている. 作成した解析モデルを図 1.3 に示す. 紫色のメッシュが筋原線維, 青色 がミトコンドリア, 緑色が T 管, 赤色が dyad, 灰色が空間を埋めるメッシュである. 小器 官の形状や体積比率の妥当性及びカルシウム反応拡散解析の結果からメッシュモデルとし ての妥当性を確認している.



図 1.3 解析モデル(3µm×3.5µm×1µm)

また,田中は抽出の手間を抑えた上で広い範囲のモデルを作成する手法の開発も行った. 図 1.3 のモデル作成に用いたミトコンドリアの手書き抽出画像 50 枚を教師画像として深層 学習により入力画像 400 枚すべてのセグメンテーションを行い,対象検出による結果と輪 郭検出による結果を組み合わせて画像処理によりモデルを作成する. 抽出に深層学習を導 入することで広範囲にわたる微細構造の抽出を可能としている. 深層学習のみではミトコ ンドリア同士の境界は精度よく検出できないため,ミトコンドリアの分割に画像処理を用 いている.手書きにより作成した図 1.3 のモデルとの比較から正しくモデルが自動作成され ていることを確認している. 大まかな流れを図 1.4 に示す.



図 1.2 手法の概要

A.Hussain の手法と同様,少ない作業量で多くのセグメンテーション結果が得られるという点でモデル作成がかなり効率化されている.また3次元モデルについても小器官の個体数や体積,離心率の観点から妥当なことから,この手法の有効性がわかる.一方で,この田中の手法で取り扱った心筋細胞画像(以下,細胞Aと呼ぶ)に対しては精度の高い抽出が可能であったが,それとは異なる新たな心筋細胞に対しては精度の良い抽出は行えなかったという点で個体差への汎用性が低いといえる.

1.3 研究の目的

過去の研究では少ない作業量で多くのセグメンテーションを行うことを可能としたが, どれも精度と汎用性の両立には至っておらず,また広い範囲でのモデリングを可能として いるものは少なかったといえる.

そこで本研究では、小器官自動抽出の汎用性を向上させてかつ精度の良いモデルを作成 する手法を開発することを目的とする.そのために、深層学習モデルの改良、及び入力画 像の強度の調節によって汎用性及び精度の向上を図る.

1.4 本論文の構成

本論文での構成を以下に示す.

第1章では、研究背景、関連する過去の研究、及び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及び深層学習の概要を述べたのちに、小器官抽出処理の手法とその精度の評価手法について述べる.

第3章では、手法の結果を述べ、考察を付す.

第4章では、本研究の結論と今後の課題について述べる.

2 深層学習による微細構造モデルの作成

2.1 心筋細胞の微細構造

2.1.1 心筋細胞の微細構造

成人の心臓では心筋細胞は体積比で約 75%,細胞数比で約 30%を占める.成人心室の心筋細胞は長さ 20~150µm,直径 10~20µm の円柱状の形状をしており,周期的に収縮と弛緩を繰り返している.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)といった小器官から構成されている.心筋細胞の微細構造の模式図を図 2.1 に示す.

筋原線維は筋肉の微細構造の構成単位であり、筋繊維方向に走っている多数の微小繊維である.内部はアクチンとミオシンと呼ばれるたんぱく質の分子集合体である2種類のフィラメントが筋繊維方向に繰り返し連なり横紋構造を構成している.その繰り返し単位は筋節(サルコメア)と呼ばれ、その境界はZ帯と呼ばれる.サルコメアの長さ(サルコメア長)はおよそ2µmである.筋原線維の直径は約1µmほどで、他の小器官に取り巻かれるようにして配置している.体積比率では50~60%を占めると言われている.

ミトコンドリアは、表面を外膜と内膜という2重の生体膜に覆われており、1細胞中に平均して300~400個、体積比で約20~30%を占めている[6]. エネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP, Adenosine Triphosphate)を生成するほか、カルシウム(*Ca*²⁺)を貯蔵し細胞内の濃度を調整するなどの役割を持つ.また、アポトーシス(個体をより良い状態に保つために生じる管理された細胞の死)においても重要な役割をもつ.

T 管は Z 帯付近を中心として筋原線維を取り巻くように配置している管状の小器官である. T 管は細胞全体に広がっており, Ca^{2+} を供給することによって細胞全体が同時に収縮するのを補助する役割を持つ.

SR は T 管に向かい合う Junctional SR(JSR), それ以外の Network SR(NSR)に分けられる. SR には Ca^{2+} を制御する役割があり, JSR は Ca^{2+} を SR から放出し NSR は Ca^{2+} を SR 内に組 み上げる機能がある.特に筋収縮を起こす Ca^{2+} の多くは JSR のリアノジンレセプター(RyR) から放出され,膜電位によって開く T 管の L 型カルシウムチャネルと JSR の RyR をあわせ て Ca^{2+} 放出機構(CaRU, Calcium Release Unit)と呼ぶ.



Z帯 JSR NSR Z帯

図 2.1 心筋細胞模式図[6]

次に心筋の収縮・弛緩機構を簡単に述べる.

筋膜状に活動電位が生じると、T 管のL型カルシウムチャネルが開き、Ca²⁺を放出する. そのCa²⁺が JSR の RyR を開き、多くのCa²⁺が細胞質に放出される.この作用機構をCa²⁺誘 発性Ca²⁺放出という.Ca²⁺がアクチンフィラメント上にあるトロポニンに結合すると、通 常アクチンフィラメントにくっついていてアクチンとミオシンの結合を邪魔しているトロ ポミオシンが移動させられる.その結果、ミオシンの頭部がアクチンと結合できるようにな り、アクチンとミオシンとの分子間相互作用によってアクチンフィラメントとミオシンフ ィラメントが互いに滑りあい筋繊維は収縮する.活動電位が発生してから収縮するまでの 過程を興奮収縮連関という.

筋収縮後,細胞質内の*Ca²⁺*濃度の高まりから*Ca²⁺*はNSR に取り込まれ細胞外へ放出される.細胞質*Ca²⁺*濃度が低下してトロポニンから*Ca²⁺*が外れると,アクチンとミオシンの相互作用が止まる.これによって,Z帯とミオシンフィラメントを結ぶばねのような構造を持つタイチンの作用も合わさり,筋繊維は弛緩する.

2.1.2 SBF-SEM

心筋細胞の微細構造の撮影法は光学顕微鏡による手法,X線顕微鏡による手法などいく つか存在する.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 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[7](SBF-SEM, Serial-Block-Face Scanning Electron Micriscope)は,試料ブロック表面をダイヤモンドナイフで薄く削り表面の構造を SEM により記録することを繰り返し行い試料の断面構造を連続的に得る手法である. SEM では走査した電子ビームが試料表面にあたって出た二次電子や反射電子,X線を検出器でとらえて電気信号に変換している. 細胞の微細構造を始めとして,ポリマーや合金,神経のシナプスなど多岐にわたった観察を可能とし,試料の3次元の構造を再構成し解析を行うことに長けている. 生体試料を観測する際は,試料を樹脂に包理したブロック状の試料を切削して

観察する.

ダイヤモンドナイフによる切削であるため、切削スピードが速く広範囲の切削を可能と する一方で、バルク試料の表面を観察するため試料に導電性を持たせる必要があるという 短所がある.また、試料の種類によっては電子線を照射すると試料がチャージして像が歪む ことがある.

2.2 深層学習

2.2.1 深層学習概要

深層学習(Deep Learning)は、物体の認識や分類の作業を機械が行う技術である機械学習 (Machine Learning)の一種である.機械学習には人間の神経回路網を模したニューラルネ ットワーク(Neural Network, NN)が使用されている. NNの構造は次の図の通りである.



図 2.2 ニューラルネットワーク(NN)概略図

NNには入力層,隠れ層,出力層の3種の層が存在し,各層のノードは前層のノードと エッジを介して繋がっている.各エッジには重みが定められており,前層の各ノードの値 に重みをかけて和をとった値を活性化関数に入力して得られる出力が次の層のノードの値 となる.活性化関数にはいくつか種類がある.隠れ層では,連続的に0~1の値をとるシグ モイド関数や,負の入力には0を出力し,正の入力はそのまま出力する ReLU(Rectified Leniar Unit)関数が主に使用される.特に画像データを用いる学習にはは基本的に正の値 しか用いないため ReLU 関数がよく用いられる.出力層では,入力をそのまま出力する恒 等関数や,式2.1のように表されるソフトマックス関数が使用される.*a_k*はk番目のニュ ーロンへの入力(入力の総数はn),*y_k*はk番目のニューロンからの出力である.恒等関数 は回帰問題に,ソフトマックス関数は分類問題にそれぞれ適している.

$$y_k = \frac{\exp(a_k)}{\sum_{i=1}^n \exp(a_i)}$$
(2.1)

機械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,本研究で用いている 教師あり学習ではまず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 は入力として処理したい画像データ,ラベルは求める出力データを指す.学習用データとラ ベルとの組み合わせをデータセットと呼ぶ.

活性化関数を通じて得られる最終的な出力とラベルの教師信号との誤差から重みを更新 する(誤差逆伝播法). その際, NN の性能の悪さの指標となる損失関数が小さくなるように 重みを更新する. これを繰り返し行うことで重みが最適化される. 損失関数には 2 乗和誤 差や交差エントロピー誤差が主に用いられる. それぞれ以下の式で表現される. *y*_k は NN の出力, *t*_kは教師データを表す.

$$E = \frac{1}{2} \sum_{k} (y_k - t_k)^2$$
 (2.2)

17

$$E = -\sum_{k} (t_k log t_k) \tag{2.3}$$

以上が機械学習の概要だが、隠れ層は複数の層を持つことが可能であり、特に深い隠れ層 を持つ学習のことを深層学習と呼ぶ。

深層学習の応用的な手法の一つとして CNN(畳み込みニューラルネットワーク, Convolutional Neural Network)があり, CNN は特に画像認識で優れた実績を収めている. CNN は NN と同様の隣接する層のすべてのニューロン間で結合がある構造(全結合層)と畳 み込み層とプーリング層と呼ばれる層から成る.それぞれの層の役割や特徴について述べ る.

畳み込み層では、畳み込み演算を行うことで入力の特徴を検出し特徴マップを作成する. 具体的な例を図 2.3 に挙げる. 畳み込み演算では入力の一部のピクセルとカーネルと呼ばれ るフィルターのピクセルを対応するピクセルごとに掛け合わせていき、足し合わせた値を 特徴マップに出力する.図 2.3 の場合緑色の部分について0×0+1×1+0×0+1×1=2 より2が出力される.カーネルを徐々にスライドしていき、特徴マップを埋める.カーネル の大きさや値、動く幅(ストライド)は様々であり、抽出する特徴によって異なる.図 2.3 の 場合は縦線の検出、または右向きに大きな勾配の検出を行っている.



図 2.3 畳み込み演算

プーリング層は, 畳み込み層から出力された特徴マップを縮小してサイズを小さくする 役割を持つ. 代表的なプーリングは図のように区切られたそれぞれの範囲の中で最大値を 抽出する Max プーリングである. プーリングすることによってピクセル数が減少するため 計算コストが下がる, 微小な位置変化に強固になるといった利点がある.



図 2.4 Max プーリング

機械学習及び深層学習の代表的な失敗の原因の一つに過学習があげられる.過学習はあるデータセットには高い精度で対応できるが他のデータセットには対応できない状態のことを指す.偏ったもしくは少ないデータセットで学習を行うことが主な要因である.過学習を抑制するための主な手法として荷重減衰(Weight Decay)や Dropout があげられる.

Weight Decay[8]は、図 2.2 にあるような重みが極端に大きな値を持つことに対してペナ ルティを科すことで過学習を抑えようとする手法である.学習の際には損失関数を小さく することを目的としていたため、損失関数に重みの 2 乗ノルムを加算することで重みを小 さく抑える.

Dropout[9]は、図 2.5 に示すように学習時に隠れ層のニューロンをランダムに選択し、そのニューロンを消去してその先の信号の伝達をストップしながら学習する手法である.テスト時にはすべてのニューロンの信号を伝達するが、各ニューロンの出力に対して学習時に消去した割合を乗算して出力する.



図 2.5 dropput の概念図[9]

2.2.2 深層学習を用いたセグメンテーション

セグメンテーションとは画像処理手法の1つであり,画像内の対象物を検出し,対象となる範囲とそれ以外の範囲とを分割する技術である.ここではどのようにしてセグメンテーションに深層学習を用いるのか述べる.

画像処理を行う際はまず画像認識を行うことから始まる.画像認識では対象物の特徴を 示す特徴量を基に対象物を検出する.簡単な例では,あるしきい値を設けて画像の強度がし きい値より上か下かで対象物か否かを判断するものがある.他にも強度値の勾配や形状な ど様々な特徴がある.人間が画像認識を行う際は対象物の特徴及び適切な特徴量は人間が あらかじめ定める.特徴と値の組み合わせは無限に存在するため適切な組み合わせを設定 するのが困難であるが,人間が設定しているため明確な根拠に基づく信頼度の高い結果を 得ることができる.

機械学習を用いて画像認識を行う場合は、特徴は人間が設定するが、適切な特徴量を機械 に学習させることで決定する.したがって、特徴の設定が適切であれば学習に必要な多数の サンプルを用意することで、未知の画像に対しても有効な画像認識を行うことができる.

一方で本研究のように深層学習を用いて画像認識を行う場合は、特徴の設定も特徴量の 決定も機械が自動で行う.機械学習の時と同様に学習に用いるサンプルの作成は必要であ るが、機械が自動的に特徴を検出し適切なパラメータを設定するため、人間には判断が難し いようなものも判断が可能となった例もある.深層学習の中でどのような特徴を抽出して いるのか完全には把握できないという問題があるが、人間と並かそれ以上の精度での検出 を可能とする.

2.2.3 CDeep3M

CDeep3M[10]は Amazon Web Service(AWS)上にある,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.入力用の画像と白黒の二 値化ラベルを入力すると、学習用データの強化を行った後に3 通りの学習モデルを作成す る.学習用データは入力されたデータセットを回転や反転させて新たなデータセットを作 成することによって強化されている.作成された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て最終的な結果を出力する.セグメンテ ーションのワークフローは次の図 2.6 のようになっている.



図 2.6 CDeep3M の画像セグメンテーションのワークフロー[10]

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 出した小器官をラベルとして学習させる.通常の深層学習モデルでは高精度な画像処理を 行うためには多くのデータセットを必要とするが,ラベルは手書きで作成しており莫大な 数のデータセットを作成するのはとても現実的ではない.大規模な深層学習モデルであれ ば何十万,何百万という数のデータセットが必要となる上に,学習に膨大な時間がかかって しまう.この問題点を解消するために本研究では転移学習を用いた.

転移学習とは、ある領域で学習したモデルを別の領域にも使用して、必要なデータの数を 少なく抑える手法である. CNN においては、入力層に近い層では普遍的な特徴を、深い層 に行くほどより細かな特徴を捉えていくため、深い層に限って再学習を行うことでパラメ ータの更新量が減り、少ないデータセットで最適化を行うことができる.本研究では、ミト コンドリアのデータセット 80 組を反復回数 30000 回で事前学習したモデルを使用してい る.

2.3 小器官抽出処理

2.3.1 教師データの作成

追加学習では SEM 画像を学習用画像として, SEM 画像内のミトコンドリアを手書き抽出

した白黒画像をラベル画像として学習させる. ミトコンドリアの輪郭を一つ一つ線でなぞり,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 2.7 に示す.



図 2.7 手書きで作成したミトコンドリアのデータセットの1例 学習用 SEM 画像(左), ラベル画像(右)

データセットは、先行研究[5]で細胞 A から作成された 50 組とは異なる心筋細胞(以下細胞 B と呼ぶ)画像で新たに 20 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, SanDiego)の星島様に提供して頂いた.

2.3.2 入力イメージ画像の強度調節

セグメンテーションを行う細胞 B の入力画像 690 枚の強度分布は,撮影環境の差から途 中で画像全体や画像内の一部で強度が変化していることがあった.この影響を小さくする ために入力画像の強度分布を調節して学習画像の強度分布に近づけることを考える.心筋 細胞画像の強度分布の例を図 2.8 に示す. 横軸が強度値で 0~255 までの値をとり,縦軸がピ クセルの数である.

21



図 2.8 強度分布の一例 心筋細胞画像(左)とその強度分布(右)

基本的に心筋細胞画像は図 2.8 のように 2 つのピークを持つ. 1 つ目のピークは画像内の ミトコンドリアによるもので, 2 つめのピークは筋原線維によるものである. 画像間の強度 分布の差を小さくするために, 2 つのピークの位置を学習用画像 70 枚で測定, 平均値を算 出し,入力画像すべてのピーク位置が学習用画像の平均値にあうようピクセル強度を式 2.4 に基づき変更した. 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,P2 はそれぞれ学習用画像の 1 つ目のピーク位置(ミトコンドリア)の平均値と 2 つ目のピーク(筋原線維)の平均値, p1,p2 はそれぞれ入力画像の 1 つ目のピーク位置の平均 値と 2 つ目の平均値である.

$$\begin{cases} 0 \le x \le p1 : \ x' = x \times \frac{P1}{p1} \\ p1 < x \le p2 : \ x' = P1 + (x - p1) \times \frac{P2 - P1}{p2 - p1} \\ p2 < x \le 255 : \ x' = P2 + (x - p2) \times \frac{255 - P2}{255 - p2} \end{cases}$$
(2.4)

強度の調節例が次の図 2.9 になる. 学習用画像のピークの平均は 162.99, 187.51 であったので, それぞれを P1,P2 として入力画像のピークを変換している.



図 2.9 強度調節例 調節前(左),調節後(右)



図 2.10 強度分布表 調節前(左),調節後(右)

図 2.10 の例では細胞外の範囲が画像に入っており細胞外の黒い部分と白い部分が図での 1 つめのピークと4 つめのピークに相当する.そのためこの場合では2 つめのピークと3 つ めのピークが P1,P2 に一致するように移動させている.

ピークを検出する際には、前後の勾配の正負を考慮して小区間でのピークが全体のピー クとはなりえない場合に限り(ピーク前後の勾配の積が正となる場合に)区間内の平均をと ってならすことで、ピークの誤検出を減らした.また、細胞外のピクセルにより正しくピー クを検出できなかった 14 枚のピークを視認により手作業で修正している.

2.3.3 深層学習による小器官抽出

CDeep3Mの深層学習を用いて小器官のセグメンテーションを行った.2.2.3 で述べた通り, 学習はミトコンドリアのデータセット 80 組を反復回数 30000 回で事前学習したモデルを使 用した転移学習にて行った. 追加学習には細胞 A の 50 組のデータセットに新たに細胞 B か ら作成した 20 組を 5 組ずつ追加していき,合計 50 組(追加なし),55 組,60 組,65 組,70 組のデータセットから 5 つの学習モデルを作成した.

入力画像には新規ラベル作成に一部使用した細胞 B の心筋細胞画像 690 枚を使用した. また,2.3.2 の入力画像の強度調節はデータセット 20 組を追加した計 70 組の場合に対して のみ行い,調節の有無でセグメンテーション結果及びモデルの精度に差が出るかを評価す る.

セグメンテーション結果は確率分布で出力される.確率分布は対象である確率が高いピクセルほど白く(強度が 255 に近く),確率が低いほど黒く(強度が 0 に近く)出力される.

対象検出と同様にして,輪郭の学習及び検出も行う.ミトコンドリアは2枚の膜をもつた め完全な検出は難しいが,大まかな輪郭がこの後の分割処理に必要となる.学習には,対象 検出の際に手書きで作成した輪郭を白く塗りつぶさずにそのままラベルとして使用した.

2.3.4 個体の分割処理

小器官の対象検出の次に小器官同士の境界を作成し分割を行う.この分割処理は田中の 手法[5]に準じて行う.分割処理には、大まかな分割画像の作成、核の抽出、核の割り振 り、核の膨張、3次元処理の5段階で構成されている.

まず,深層学習によって得られた対象全体と輪郭の結果の2値化画像の差をとり,図 2.11のような大まかな分割画像を作成する.



図 2.11 大まかな分割画像

大まかな分割画像に対してガウスぼかし(ガウシアンぼかし, Gaussian Blur)と2値化を使用して核の抽出を行う.ガウスぼかしは画像のぼかし手法の1つで,以下の2次元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.eはネイピア数,oは周辺何ピクセルを対象としてぼかすかを示すガウス係数で任意に設定できる.x,yは対象ピクセルからの距離である.ガウスぼかしを行った後にピクセル強度が255であるピクセルのみを残す2値化を行う.

$$G(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}}$$
(2.5)

核の抽出を行った後に、各それぞれに別々のマークをつけることで図 2.12 のように核を 識別する.



図 2.12 ガウスぼかし(左), 2 値化(中), 核の識別(右)

識別された核をセグメンテーション結果に重ねてそれぞれを膨張させ、ほかの核と接触 したピクセルを黒くすることで図のような分割画像を得る.

これを3次元に拡張して行うことで、2次元分割では余分に分割されてしまった箇所をz 軸方向のつながりから同一個体であったと判断し修正することができる.こうして図のよ うに3次元分割画像が作成される.こうして得られた分割画像の輪郭を抽出して重ね合わ せることでモデルを作成する.



図 2.13 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 小器官抽出結果の分類

画像はピクセルごとに色の情報を持つ.カラー画像では三原色の各原色で独立した 0~255

の値を持っており、白黒画像では 0~255 のいずれかの値を持つ. 0 が黒を表し、255 が白を 表す. 出力画像のピクセルベースでの結果は真陽性(TP, Truer Positive), 偽陽性(FP, False Positive), 偽陰性(FN, False Negative), 真陰性(TN, True Negative)の4通りのいずれかに分類 される. TP は正のピクセルを正しく正と判断した場合, TN は負のピクセルを正しく負と判 断した場合である. FN は正のピクセルを誤って負と判断した場合, FP は負のピクセルを誤 って正と判断した場合である. 4 通りの結果をまとめた表 1 と,分類の例となるラベルと出 力結果の図 2.14 を以下に示す.

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

表1 結果の分類



図 2.14 セグメンテーション結果の分類の例

2.4.2 評価指標

ピクセルベースでの分類結果に基づいて評価の指標を定める.その際,4種類の分類の内 どれを重視するかによって適当な評価指標が変わるため,対象や手法に応じて評価指標を 選択する必要がある.

本研究ではセグメンテーションで使用されることの多い評価指標である適合率(Precision), 再現率(Recall), F 値(F-score)の3つの評価指標を使用する.適合率と再現率の計算式は次の 式 2.6, 2.7 の通りである.

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$
(2.6)

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$
(2.7)

適合率は正の出力の内どれだけ実際に正しいかの割合であり,正確性を示す指標である. 再現率はラベルが正であるものの内どれだけ正しく出力できたかを示す割合であり,網羅 性を示す指標である.適合率と再現率はトレードオフの関係にあり,適合率は対象を正しく 抽出できているか(FN が低く抑えられているか)を保証せず,再現率は対象以外を抽出しな いこと(FP が低く抑えられているか)を保証していない.これらを2つの評価指標の内容を 含むのが F 値である.F 値は適合率と再現率の調和平均をとった指標である.F 値の計算式 は式 2.8, 2.9 のとおりである.

$$\frac{1}{F-score} = \frac{1}{2} \times \left(\frac{1}{Precision} + \frac{1}{Recall}\right)$$
(2.8)

$$F - score = \frac{2 \times Recall \times Precision}{Recall + Precision}$$
$$= \frac{2 \times TP}{2 \times TP + FP + FN}$$
(2.9)

小器官の抽出に際して対象の小器官のみを残さず抽出することが求められていることか ら、本研究では適合率、再現率、F値の3種類を評価指標に使用する.

2.4.3 しきい値の設定

セグメンテーション後の画像は 0~255 の強度を用いた小器官の存在確率の分布として出 力される.この出力を白黒画像のラベルと比較して精度を評価するために出力結果を二値 化によって白黒画像に変換する必要があるが,二値化のしきい値によって精度の値は変化 する.しきい値による精度変化のイメージは図 2.15 の通りである.横軸がしきい値,縦軸 が各評価指標の精度である.





したがって、出力画像に対してしきい値を 0~255 まで変化させて各しきい値で F 値を計算し、F 値が最大となるしきい値を評価用のラベルに対応する分だけ行いその平均値を全体のしきい値として用いることとする.評価用のラベルには学習の教師としては使用していないものを用いる.

2.4.4 個体分割の評価

分割処理後に作成したモデル内の小器官の数や体積,ミトコンドリアを長球に近似した際の離心率及び主軸の筋原線維方向に対する配向性の観点から先行研究の値と比較して評価を行う.

離心率と配向性を算出する際は,長辺を軸に楕円を回転させた形状である長球にミトコ ンドリアを最小二乗法近似することで算出した.以下具体的な手法を述べる.



図 2.16 長球

まずミトコンドリアの全輪郭点の座標から最小二乗法により主軸を求める. zx 平面と yz 平面に輪郭点をそれぞれ投影したときの平面上での主軸を z 座標の一次式として最小二乗 法により求め,得られた 2 面の交わる交線を主軸とした.

その主軸の方向ベクトルが x 軸の向きと重なるようミトコンドリアの座標を回転させる. 図 2.17 のようにまず zx 平面上に乗るように z 軸を中心に $-\alpha$ 回転させて, x 軸と重なるよう に y 軸を中心に+ β 回転させる.



図 2.17 主軸回転イメージ

主軸の方向ベクトル(a, b, 1)として回転を回転行列の式で表すと次式のようになる.

$$R_z = \begin{bmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$
(2.10)

$$R_{y} = \begin{bmatrix} \cos\beta & 0 & \sin\beta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin\beta & 0 & \cos\beta \end{bmatrix}$$
(2.11)

$$R_{y} \times R_{z} \times \begin{pmatrix} a \\ b \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} t \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$
 (t は任意の実数) (2.22)

$$\therefore \begin{cases} -a\sin\alpha + b\cos\alpha = 0\\ -a\sin\beta\cos\alpha - b\sin\alpha\sin\beta + \cos\beta = 0 \end{cases}$$
(2.23)

$$\therefore \begin{cases} \alpha = \tan^{-1}\frac{b}{a} \\ \beta = \tan^{-1}\frac{1}{a\cos\alpha + b\sin\alpha} \end{cases}$$
(2.24)

こうして得られたα,βを用いてミトコンドリアの輪郭点を同様にして回転させる.

その後中心が原点になるように x 軸上を移動させたのち,最小二乗法により式 2.25 の形 になるよう長球近似を行う.長球の長辺を a,短辺を b としている.

$$\left(\frac{x}{a}\right)^2 + \left(\frac{y}{b}\right)^2 + \left(\frac{z}{b}\right)^2 = 1$$
 (2.25)

以下の式に基づき離心率 e を算出し、ミトコンドリアの主軸と筋原線維に垂直な Z 帯の 法線ベクトルとのなす角θを配向性として求める.

_

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2} \tag{2.26}$$

3 結果と考察

3.1 深層学習モデルの比較

3.1.1 セグメンテーション結果の比較

評価用に学習に用いていない入力画像の各モデルでのセグメンテーション結果を以下に 示す.図 3.1 が入力画像とその正解ラベルで,図 3.2 が順にデータセットを 0,5,10,15,20 組 追加したときの結果である.



図 3.1 入力画像(左),正解ラベル(右)





データセットを追加するごとにミトコンドリアのみを精度よく抽出できていくことが視 覚的に分かる.図 3.3 は先行研究[5]における細胞 A の結果の一枚である.学習に使用した 画像の結果であることもあって,かなり高い精度でセグメンテーションできていることが わかる.これと比較すると中央上部の細胞外の部分や筋原線維を多くセグメントしている ことが伺える.汎用性を高めるために異なる心筋細胞画像を混ぜて学習モデルを作成した 結果,精度が下がってしまったと言える.

また,追加データセットの少ない段階ではよいセグメンテーションができていないこと から,先行研究は1種類の心筋細胞画像しか学習に用いていなかったことから未知の画像 には良いセグメントのできない状態,過学習を起こしていたと言える.



図 3.3 先行研究の予測結果[5]

セグメンテーション結果をそれぞれの F 値が最大となるしきい値で 2 値化した結果が図 3.4 である.





図 3.4 二值化画像

順に追加データセット数0組,5組,10組,15組,20組

図 3.1 の正解ラベルと比較すると 15 組,追加したところからミトコンドリアを良く抽出で きていることが見て取れる. 各モデルでの各評価指標が次のグラフ及び表である.



図	3.5	追加デー	タセッ	\mathbf{F}	と	F	値の関係
---	-----	------	-----	--------------	---	---	------

	適合率	再現率	F 値		
0 組追加(しきい値 5)	0.466	0.625	0.534		
5 組追加(しきい値 76)	0.414	0.635	0.501		
10 組追加(しきい値 57)	0.533	0.739	0.620		
15 組追加(しきい値 183)	0.884	0.921	0.902		
20 組追加(しきい値 155)	0.912	0.932	0.922		
先行研究[5](しきい値 198)	0.922	0.967	0.948		

表 2 F値最大点での精度

35

15 組の追加で急激に F 値が増加, 20 枚追加で 0.922 まで上昇した.先行研究よりも精度 が若干低いことがわかるが,その主な要因は再現率の差といえる.再現率はラベルが正であ るものの内どれだけ正しく出力できたかを示す割合であったため,先行研究に比べて取り こぼしがあることがわかる.

細胞 A では 20 組程度のデータセットで表 2 と同程度の精度で抽出ができている[5]ので, 必要な枚数は減ってはいないと言える.汎用的な深層学習モデルを作成するためには,同じ 心筋細胞画像から複数のデータセットを作成するよりも様々な種類から作成する必要があ るため,効率の良い学習モデルづくりが必要とされる.これは転移学習データに合わせた強 度の調節を行ってから学習モデルを作成することで解消されることが予想される.この方 法については 4.2 項でも後述する.

20 組追加時におけるしきい値と各種評価指標のグラフを図 3.6 に示す. 20 組追加のモデル作成時に用いるしきい値はこの結果から 155 としている.



図 3.6 しきい値による評価指標の変化

3.1.2 分割処理後の比較

分割処理の結果を図に示す.また、ミトコンドリアの個体数、体積、離心率、及び配向性のデータを表 3 及び図 3.7, 3.8, 3.9 に示す.



図 3.7 入力画像(左),分割処理結果(右) 表 3 ミトコンドリアの個体数,平均体積,体積率

	撮影範囲のサイズ (μm ³)	個体数	平均体積(µm ³)	体積率(%)
細胞 A[5]	$14 \times 14 \times 28$	1177	0.9367	20.04
細胞 B(本研究)	$14.3 \times 14.3 \times 48.4$	2801	0.9472	26.68



図 3.8 離心率の比較 手書きによるデータ[2](左),細胞Aと細胞Bのデータ(右)



図 3.9 配向性の比較

手書きによるデータ[2](上),細胞 A(下左)と細胞 B のデータ(下右)

図 3.7 を見比べると深層学習だけでは再現できなかったミトコンドリアの境界が表現で きるようになっていることが分かる.しかし,再現できていない境界も一定数存在しており, また存在しいなかったミトコンドリアが生成されている箇所も見られる.ミトコンドリア の体積比率は本研究では 26.68%となったが,ミトコンドリアの体積比率は 20~30%を占め るといわれている[6]ので一致しているといえる.

図 3.8 では横軸をサルコメア長,縦軸を離心率として Rog-Zielinska らの手書きのデータ [2]と比較をしている.細胞 A 及び本研究の細胞 B のサルコメア長は入力画像の中から無作 為に5箇所計測して平均をとった値である.エラーバーは 99.99%信頼区間を示すので,同 じサルコメア長において概ね一致していると言える. 図 3.9 では離心率と同様にして配向性を比較している. ミトコンドリアは筋原線維方向に 長く配置しており,図 3.9 上図のようにサルコメア長が長くなるほど筋原線維に沿った低い 配向度のミトコンドリアが増加する.しかし,細胞 A,B ともに 50°より大きい角度のミト コンドリアが多く存在した.

このような結果となった原因として共通していることは複数考えられる.

まず,画像処理に用いた輪郭データの精度が十分に高くなかったことが挙げられる. ミト コンドリアの外膜と内膜が類似しており境界の学習を精度よく行えないことに起因する[5] ため,教師データを増やして輪郭学習モデルの精度を高めて対処する必要がある.

次に,強度の差分をとって分割処理する際のしきい値が適切でなく,核抽出の段階で分か れるべき核がまだつながっていたり核があるべきでないところに作成されたりすることが 挙げられる.本来長球状で細長いミトコンドリアが途中で分断されることで筋原線維に沿 わない大きな配向度をもつミトコンドリアが存在したと考えられる.これは、ラベル内の個 体の個数などからフィードバックをとることにより輪郭データの適切なしきい値を定める 必要がある.ただし、画像の枚数が多いと適切なしきい値が幅を持ちスライスによって異な るため、一つに定めるのは適切ではなくこのことを踏まえたしきい値を設定しなければな らない.

また,モデルの境界面上に存在し欠けているミトコンドリアもこれらのデータには含ま れており,配向度を押し上げていると考えられる.そのため,境界に接する個体を弾く必要 がある.

3.2 入力画像の強度調節

出力結果の一例を以下に示す. 3.1 項と同じスライスで,図 3.3 が強度調節後の入力画像 と正解ラベル,図 3.4 が強度調節前と後でのセグメンテーション結果である.



図 3.10 強度調節後の入力画像(左),正解ラベル(右)

結果と考察



図 3.11 セグメンテーション結果

強度調節前(左),強度調節後(右)

ミトコンドリアの白色の強度が増しており,確率が上がっていることが分かる,強度調 節前後での評価指標の比較を表4に示す.

表 4 強度調節前後での精度

	適合率	再現率	F值
強度調節前	0.912	0.932	0.922
強度調節後	0.912	0.935	0.923

僅かではあるが精度は向上していることが数値からも分かる.

正解ラベルを作成していないため数値で精度を見ることができないが視覚的にかなり精度が上がっていることがわかる例もあったので以下に示す. ラベルがなく適当なしきい値が定められないため二値化前の画像を示している. 図 3.12 が強度調節前の入力画像, 図 3.13 がセグメンテーション結果である.



図 3.12 入力画像



図 3.13 セグメンテーション結果 強度調節前(左),強度調節後(右)

図 3.9 のスライス近辺の数枚は他のスライスよりも全体的に強度が大きく撮影されていたため、図のように確率が低く出力されており二値化ではじかれてモデル化できずにいたが、強度調節によって図右のようにミトコンドリアを高い確率で抽出できるようになっている.

また、今回のこの手法はミトコンドリアと筋原線維のピークが分かれるように SEM 画 像が撮影されている状況を前提としている.本研究で用いた心筋細胞の中には図のように 筋原線維とミトコンドリアがかなり近い強度で撮影されているスライスがあった.図上部 のミトコンドリアの強度がおよそ 158~163、筋原線維の強度がおよそ 157~170 であり、範 囲が重なっている.強度分布においても、161、176、184 の3 箇所にピークがあり、本来ミ トコンドリアのピークである1 つめのピークに筋原線維も含まれている.2 つめのピーク は図下部の筋原線維によるものであるため、下部では正しい抽出が行われたが、上部では 筋原線維とミトコンドリアの両方をミトコンドリアとして抽出している.その結果が図 3.14 である.図3.15 は強度調節後の結果である.



図 3.14 強度が分かれていない入力画像(左), 強度分布(右)



図 3.15 筋原線維がセグメント されている例 図 3.16 筋原線維の確率が低い セグメンテーション結果

強度を調節する手法はミトコンドリアと筋原線維の差を学習モデルにとって明確なもの にするために行っているため、元々差がない区域に関しては意味をなさない.一方で、強 度調節前の3.1項で評価した20枚追加モデルの結果が次の図3.16である.強度調節前の 結果は精度では調節後のモデルに劣っていたが、ミトコンドリアに比べて筋原線維の確率 が低く出力されていることが図からわかる.大まかな強度の違いだけでなく強度の機微や マクロな形状を学習して推測していることが考えられ、強度調節によりそれを活かせなく なっていることがわかる.

	結言
1	絵画
4	

4.1 結論

広範囲にわたったモデルの作成を可能とするミトコンドリアの自動抽出手法の精度及び 汎用性を F 値や体積,離心率,配向性の観点から確認し,分割精度を高めることで3次元モ デル作成に有用となることを確認した.

強度の調節はスライス全体にわたる精度の向上に有効であることがわかったが、ミトコ ンドリアと筋原線維で強度分布に 2 つのピークがあるという前提がない場合にミトコンド リアを単体でセグメントするのが困難になった.

4.2 今後の課題と展望

本研究では作成した学習モデルに使用した教師用データセットの強度分布にあわせて入 力画像の分布を調節し、学習は強度調節前の画像で行った.この順番を変えて、調節後の画 像を用いて学習モデルを作成することで、ピークが分かれていない場合のセグメントが改 善されると考えられる.さらに先に転移学習に用いているデータの強度分布にならってす べての画像の調節を行うことで精度の向上との両立も見込まれる.

入力画像内の細胞外の範囲を先に弾いておくことで学習の精度を高めることができると 考えられる.また,強度抽出の際のピーク抽出の精度を高めることができる.

謝辞

謝辞

本研究は多くの方のご指導、ご協力を賜りました.

まず,指導教員の波田野明日可講師には研究の最初から最後まで大変お世話になりました.研究の指針が定まらない時や問題が起きる度に丁寧かつ的確な指導をして頂きました.泉聡志教授,高本聡元助教授にも研究の道筋を示していただき,多くの知識や示唆を 頂きました.感謝申し上げます.

カリフォルニア大学サンディエゴ校の星島様には心筋細胞画像を提供して頂きました. ありがとうございました.

博士の榊間さんを始めとして、本研究室の先輩方にも大変お世話になりました.特に小林さんはプログラミング面で詰まったときに何度も適切な手段を提示してくださりました.本当にありがとうございました.

最後に,共に卒業論文を執筆した研究室の同期,これまで私を支えてくださった両親に感 謝の意を表して,謝辞とさせて頂きます.

2020年1月30日 染谷 誠

参考文献

 A. Maloyan *et al.*, "Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in α-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy," *Circulation*, vol. 112, no. 22, pp. 3451–3461, 2005.
 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.

[3] C. H. T. Kong, E. A. Rog-Zielinska, C. H. Orchard, P. Kohl, and M. B. Cannell, "Submicroscopic analysis of t-tubule geometry in living cardiac ventricular myocytes using a shape-based analysis method," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 108, pp. 1–7, Jul. 2017.

[4] 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 Structual Biology*, vol 202, pp. 275–285, 2018.

[5] 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.
[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] T. J. Deerinck, E. a. Bushong, a. Thor, and M. H. Ellisman, "NCMIR methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy," *Microscopy*, pp. 6–8, 2010.

[8] A. Krogh, "A simple weight decay can improve generalization," *NIPS'91*, pp. 950–957, 1991.

[9] N. Srivastava *et al.*, "Dropout: A Simple Way to Prevent Neural Networks from Overfitting," *Journal of Machine Learning Research*, vol. 15. pp. 1929–1958, 2014.

[10] 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.

卒業論文

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

2020年1月30日提出

指導教員 波田野 明日可 講師

03-180200 染谷 誠