# 修士論文

# 深層学習を用いた心筋細胞モデルの作成と 力学電気生理連成解析

# 2022年 2月 7日提出

指導教員 波田野 明日可 講師

37-206217 染谷 誠

## 深層学習を用いた心筋細胞モデルの作成と力学電気生理連成解析

学生氏名:染谷 誠,指導教員名:波田野 明日可 講師

Key word: Cardiomyocyte, Deep learning, Realistic geometry, Reaction-diffusion analysis, Finite element method

### 1. 序論

一般に、心筋梗塞などの心疾患を患った心筋細胞は、形態 が乱れること、生理的・力学的機能が低下することが知られ ている[1]が、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.

心筋細胞内小器官の形状を取り出して形状の評価を行う 研究は数多く存在する.小器官抽出には,手書きによる手法 [2]や深層学習を用いた手法[3,4]などが行われてきた.

また、近年の計算機技術の発展に伴い、医療にシミュレー ション技術を取り入れた研究が数多く行われてきた.望月[5] は、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡(SBEM)画像から手 書きの抽出により作成された実形状心筋細胞モデルを用い た力学電気生理連成解析により、収縮現象の再現に成功した. 病理状態の異なる様々な細胞の実形状モデルに対してこの 解析を行うことで、微細構造の形態変化と心筋機能低下の因 果関係に迫ることができる可能性は十分に考えられる.

本研究では、心筋細胞 SBEM 画像から深層学習を用いて 作成した実形状細胞モデルを用いて力学電気生理連成解析 を行うことによって心筋細胞の収縮運動を再現することを 目的とした.

### 2. 微細構造モデル作成に関する基本的事項

心筋細胞は主に、心筋を構成する筋原線維、エネルギーの 生成を行うミトコンドリア、筋膜上に生じる膜電位を細胞内 に伝達する T 管、 $Ca^{2+}$ の制御を行う SR から構成される. SR は T 管に向き合って存在する JSR と網目状に存在する NSR に分けられる.筋膜上で発生した活動電位が細胞内に伝 達されると、 $Ca^{2+}$ が JSR から放出され、筋原線維における  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇することで収縮力が生じる(興奮収縮連関). 筋収縮後,  $Ca^{2+}$ が NSR を介して取り込まれ,  $Ca^{2+}$ 濃度が低 下することで筋原線維は弛緩する.

## 3. 深層学習を用いたミトコンドリアモデルの 構築

#### 3.1 手法

正常な2種類のマウスの心筋細胞(Cell A, B)及び MLP が欠 落した心不全マウスの心筋細胞(Cell C)微細構造の SBEM 画 像に対してモデル構築を行った。先行研究[3,4]と同様に細胞 画像のセグメンテーションに特化した深層学習モデル CDeep3M[6]を使用してミトコンドリアを抽出した。その際、 学習に使用する教師画像の種類と数をパラメータとしてセ グメンテーションを行い、教師の条件が抽出精度 F 値に及ぼ す影響を評価した.(i)Cell A を Cell A の教師 0-50 組から抽 出,(ii)Cell B を Cell B の教師 0-20 組から抽出,(ii)Cell B を Cell A の教師 50 組と Cell B の教師 0-20 組から抽出,(iv)Cell C を Cell A の教師 50 組と Cell B の教師 30 組から抽出,の4 パターンでセグメンテーションを行った。

深層学習による抽出の後,田中[3]の手法に基づいて分割を 行った.分割されたミトコンドリアの3次元形状を体積や長 球近似した際の離心率,線維方向と長軸のなす角度,短軸長 から評価した.

#### 3.2 結果と考察

深層学習によるセグメンテーション(i)-(iii)の結果を以 下のFig.1に示す.5~10枚程度の教師作成により高い精度で 抽出できることが判明した.また,(iv)の結果はF値0.929と なった.このことから,異なる細胞の教師画像を用いた抽出 の際には,強度分布形状の差により抽出精度は大きく変わる ことが判明した.



Fig. 1 Effects of the numbers of train data on F1-score

ミトコンドリアの三次元形状の評価に関しては,離心率, 配向性,短軸長の分布において先行研究[2]の結果と定性的な 一致が見られた.

正常な細胞 A,B と病態細胞 C との間では、体積分布に違いが見られた(Fig.2). 離心率や短軸長には大きな違いはなかった. このことから、ミトコンドリアの合体と分離の際に、正常な細胞は病態細胞と比べて小さく分離して大きく合体しようとする傾向にあることが推測される.



Fig. 2 Relative frequency of mitochondria volume

## 4. 画像処理を用いた T 管の 3D モデル構築

### 4.1 手法

SBEM 画像から画像処理によってT管の抽出を行った.第 3章の手法によってミトコンドリア及び筋原線維として抽出 されなかった領域の中から,二値化処理とエッジ検出,モル フォロジー演算を組み合わせることで形状を抽出した.

#### 4.2 結果と考察

T管の球状の領域がよく抽出された一方で、細い領域はほ とんど抽出することができず、T管の網目構造は不完全に抽 出された(**Fig.3**). 細い領域の抽出には、検出するエッジを細かくするなど画像処理の工夫や、本手法で抽出された球状領域から細い領域の探索などを行う必要がある.



Fig. 3 3-dimentional model of T-tubules

### 5. 力学電気生理連成解析

### 5.1 手法

解析に用いるメッシュ作成及び各小器官の定義は以下の ように行った.第3章の手法で抽出されたミトコンドリア, 細胞質,細胞外領域,筋原線維に対してテトラ要素を作成し た.次に,第4章で抽出された領域に対応する細胞質内の節 点をT管の接点として定義した.細胞外領域と細胞内のメッ シュが接する面に作成した三角要素を細胞膜に定義した. NSR は筋原線維の周囲に三角要素を作成することで定義し た.JSR はT管節点に最近傍のNSR 節点とした.

力学電気生理連成解析は、望月[5]の解析プログラムに基づいて行った.電気生理現象は、反応拡散方程式に基づいて再現される.陽解法を用いて、タイムステップは最大1.0×10<sup>-3</sup> ms、最小1.0×10<sup>-7</sup> msとした.力学現象は、超弾性体の構成則を用いて力学平衡方程式を解くことで再現される.陰解法を用いて、変形のタイムステップは1msとした.現象時間が1000 ms 経過した時点で計算を終了した.

## 5.2 結果と考察

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は 43 ms で約 0.49 μMのピークを示して おり、その後は徐々に減少し、約 0.14 μMに収束した(Fig. 4 エラー!参照元が見つかりません。). 200 ms における減少勾 配の変化も含めて、濃度変化の様子は膜電位の変化に対応し





Fig. 4 The change of calcium ion concentration

望月[5]の結果と比較すると、ピーク値で約 60%小さい結 果となった.これは、モデル内に含まれる JSR 節点数が少な いことにより、放出される*Ca<sup>2+</sup>が*少ないためであると考え られる.JSR 節点は第3章において抽出された T 管の結果を 基に定義されており、T 管の精度の改善が重要となる.また、 抽出された T 管の球状領域を線維方向に繋いで T 管の細い 領域を簡易的に模擬することで改善を図ることができる可 能性がある.

細胞内収縮力は 156 s で 3.15 kPa のピークを示し,その後 は緩やかに減少した(Fig. 5). 筋原線維における収縮力の分布 (Fig. 6)は筋原線維内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に伴った変化となった.





Fig. 6 The distribution of calcium ion concentration in myofibrils

## 6. 結論

心筋細胞微細構造の SBEM 画像から,深層学習及び画像 処理に基づく手法を用いて細胞内小器官の形状を抽出する ことで,実形状細胞モデルを作成した.その際,ミトコンド リアを高い精度で抽出する条件を明確にし,他の細胞画像に 適用する道筋を示した.

また,作成したモデルを使用して力学電気生理連成解析を 行い,心筋細胞の収縮現象の再現を行った. 膜電位の変動に 伴った細胞内の基質の変化や, *Ca*<sup>2+</sup>濃度の変動に伴った収 縮力の変動が確認された.

### 参考文献

[1] A. Maloyan *et al.*, *Circulation*, vol. 112, no. 22, pp. 3451–3461, 2005.

[2] E. A. Rog-Zielinska, et al., Anat. Rec., vol. 302, no. 1, pp. 146–152, 2019.

[3] 田中宏明, 東京大学大学派遣論文, 2019.

- [4] 染谷誠, 東京大学卒業論文, 2020.
- [5] 望月優, 東京大学卒業論文, 2021.
- [6] M. G. Haberl *et al.*, *Nat. Methods*, vol. 15, no. 9, pp. 677–680, 2018.

日次

1	序論		9
	1.1 研究	名の背景	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 先往	行研究	11
	1.2.1	小器官の形状と機能	11
	1.2.2	強度分布を利用した小器官の抽出	11
	1.2.3	深層学習を用いた小器官の抽出	12
	1.2.4	心筋細胞モデルを用いた現象の再現	13
	1.3 研究	窀の目的	15
	1.4 本言	<b>侖文の構成</b>	15
2	微細構i	告モデル作成に関する基本的事項	16
	2.1 心角	<b>第細胞</b>	17
	2.1.1	心筋細胞の微細構造	17
	2.1.2	興奮収縮連関	18
	2.1.3	心筋細胞の SBF-SEM 画像	19
	2.2 深層	<b>喜学習</b>	20
	2.2.1	深層学習概要	20
	2.2.2	深層学習を用いたセグメンテーション	23
	2.2.3	CDeep3M	24
3	深層学習	習を用いたミトコンドリアモデルの構築	25
	3.1 緒言	₫	26
	3.2 抽出	出手法	26
	3.2.1	SBEM 画像の準備	26
	3.2.2	教師データの作成	27
	3.2.3	深層学習による小器官抽出	
	3.2.4	個体の分割処理	
	3.3 評价	西方法	31
	3.3.1	小器官抽出結果の分類	31
	3.3.2	評価指標	32
	3.3.3	しきい値の設定	
	3.3.4	幾何学的形状の評価	
	3.4 結界	畏	
	3.4.1	深層学習によるミトコンドリア抽出	
	3.4.2	SBEM 画像の強度調節	
	3.4.3	ミトコンドリアの三次元形状	
	3.5 考察	<u>र</u>	42
	3.5.1	教師画像の種類の抽出精度への影響	42
	3.5.2	強度調節の抽出精度への影響	43

	3.5.3	ミトコンドリア三次元形状の妥当性	44
	3.5.4	病態のマウスと正常なマウスとの比較	47
4	画像刘	処理を用いた T 管の 3D モデル構築	49
4	.1 緯	营	50
4	.2 排	由出手法	50
4	.3 緯	5果と考察	51
5	力学電	意気生理連成解析	54
5	.1 緯	音	55
5.	.2 解	释析手法	55
	5.2.1	細胞モデルのメッシュ作成	55
	5.2.2	電気生理現象の記述	
	5.2.3	力学現象の記述	
	5.2.4	解析条件	
5.	.3 緯	5果と考察	61
	5.3.1	Ca2+拡散解析の評価	61
	5.3.2	力学的変形の評価	
6	結言		
6	.1 結	노크스 ㅋ 때	69
6	.2	*後の課題と展望	69
謝辞	辛		
参考	含文献		71

図日次	

図目次

図目次

义	1.1	手法の概要12
义	1.2	作成されたミトコンドリアモデル13
义	1.3	波田野[12]のモデル14
义	1.4	望月[14]のモデル14
义	2.1	心筋細胞模式図[12]17
义	2.2	筋原線維模式図18
汊	2.3	心筋細胞 SBEM 画像(左). 1 辺 14µm. 図中央は細胞外領域. 赤線部を拡大し
	た匪	国像(右). ミトコンドリア(M), 筋原線維(MF), T管(T)
义	2.4	図の心筋細胞 SBEM 画像の強度分布. 横軸が強度(0-255), 縦軸が頻度20
义	2.5	ニューラルネットワーク(NN)概略図21
义	2.6	畳み込み演算
汊	2.7	Max プーリング
汊	3.1	強度調節の例 調節前(上),調節後(下). Icenter k を Imean=175.25 に一致する
	よう	うに強度分布全体を シフトさせている
汊	3.2	作成したミトコンドリアのデータセットの1例 学習用 SBEM 画像(上),対象
	ライ	ベル画像(左),輪郭ラベル画像(右). ラベルは可視化のために 0-255 の二値で表
	示さ	されている
汊	3.3	対象と輪郭の差分を取った分割画像
汊	3.4	ガウスぼかし(左),2値化(中),核の識別(右)
汊	3.5	手書きラベル(左), 2 次元分割画像(中), 3 次元分割画像(右)
汊	3.6	セグメンテーション結果の分類の例
汊	3.7	長球
汊	3.8	長球近似
汊	3.9	主軸回転
汊	3.10	教師数のF値への影響
汊	3.11	細胞 B の抽出結果
汊	3.12	ミトコンドリアの体積の分布40
汊	3.13	ミトコンドリアの離心率の分布41
汊	3.14	ミトコンドリアの配向性の分布41
汊	3.15	ミトコンドリアの短軸長の分布42
汊	3.16	各細胞の SBEM 画像とその強度分布の例43
汊	3.17	手書きによって抽出された領域の 3D モデル45
汊	3.18	手書きで抽出されたミトコンドリアの体積分布45
汊	3.19	手書きで抽出されたミトコンドリアの離心率分布46
叉	3.20	手書きで抽出されたミトコンドリアの配向性分布46

义	3.21	ミトコンドリアの 3D 図と長軸	.47
义	3.22	筋原線維が曲がっている箇所の例(細胞 B)	.47
义	4.1	T 管抽出手法のフロー	.51
义	4.2	細胞 A の T 管抽出結果例	.52
义	4.3	細胞 B の T 管抽出結果例	.52
図	4.4	細胞 A の T 管 3 次元モデルの一部	.53
図	5.1	有限要素解析モデル	.56
図	5.2	有限要素解析モデル(細胞外領域なし)	.57
図	5.3	ミトコンドリアの形状	.57
図	5.4	細胞質の形状	.57
図	5.5	筋原線維の形状	.58
図	5.6	NSR の形状	.58
义	5.7	計算のアルゴリズム	.60
図	5.8	細胞内におけるCa2+濃度変化	.62
図	5.9	膜直下におけるCa2+濃度変化	.62
図	5.10	NSR におけるCa2 +濃度変化	.63
図	5.11	断面位置	.64
図	5.12	断面画像	.64
図	5.13	筋原線維における <b>Ca2 +</b> 濃度の分布	.65
図	5.14	収縮力の変化	.66
図	5.15	筋原線維における収縮力の分布	.67

表日次	

7

表 1	学習条件	29
表 2	結果の分類	32
表 3	深層学習によるミトコンドリア抽出結果	37
表 4	強度調節の有無の抽出精度への影響	39
表 5	ミトコンドリアのモデル内の個数及び平均体積	40
表 6	細胞モデル内の JSR 節点数の比較	62

1	序論

# 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、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.近年では計算機技術の進歩及びシミュレーシ 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と考えられて いる.

### 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から構成されており、心筋細胞の働きにより心臓全体が 収縮し、内部の血液が内圧により押し出される形で全身に血液が送り出されている.

正常な心筋細胞では、心筋を構成する筋原線維という小器官の主方向に沿って各小器官 が列状に一定の規則性を伴って配置している.一方で、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たり、向きや形状が一様ではなくなったりなど、正常な心筋細胞と 比べると不規則な配置となる事例がある[1].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が、 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 モデルを作成して心筋の機能をシミュレーションすることは、この因果関係のメ カニズムの解明、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.

# 1.2 先行研究

# 1.2.1 小器官の形状と機能

心筋細胞の小器官の形状と機能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 ンドリアの三次元形状を走査型電子顕微鏡(SEM)画像から輪郭を手書きすることで抽出し、 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.その際、ミトコ ンドリアを長球として近似し、その長軸の向きや離心率から形状を評価している.筋節長が 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する傾向を 持つことや、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が明らかに なった。また、複数のミトコンドリアが結合して、細長く蛇行した形状のミトコンドリアも 観測されている.これは、代謝症候群の心筋によく観測されるものである[3].

C.Kong[4]は、蛍光プローブを用いた観測と画像処理を用いて計測した表面積や内部体積 から、生きた細胞内の T 管径を幾何学的に測定するという手法を開発した.T 管径から体積 や配向性の導出を可能としており、ウサギやマウスの測定結果に関する妥当性が示されて いる.病態の細胞では T 管は損失及び正常ではない形態となることが知られている[5,6]が、 この手法によって病態の生細胞の T 管観測もまた可能となった.

小器官の形状の分析及び形状と機能の関係にまつわる議論は数多く行われている.形状 を得る際,手書きによる抽出は高い精度を伴うことができる一方,手間と時間を要するため 広くデータをとるということは難しい.

## 1.2.2 強度分布を利用した小器官の抽出

前述のとおり、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、広い範囲 に及ぶモデルや複数種類のモデルを手書きから作成するというのは現実的に不可能である. この困難を解消したのが A.Hussain[7]の手法である. 心筋細胞試料表面の切削と走査型電 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(SBF-SEM)し、細胞の外部 と内部を隔てる細胞膜を断面スライス 10-20 枚おきに手書きで抽出する. 細胞内の画像の強 度分布は二峰性をもつという特徴を利用して、ピクセル強度からピクセルがどの小器官に 属するかを判定するというのがこの手法である. ミトコンドリア及び筋原線維を高い精度 で抽出することが可能となっている. また、手書き中心の抽出と比べて少ない作業量での抽 出が可能となっている. ただし、細胞画像の小器官ごとに強度がはっきり分かれていること を前提としており、SBEM 画像の撮影環境が肝要とも指摘されている. また、小器官は群と して抽出されており、個々に抽出するところまでは行われていない.

## 1.2.3 深層学習を用いた小器官の抽出

さらに効率的に小器官の抽出を行う手法として,深層学習を用いた抽出手法が挙げられる.

M. Iqbal[8]は、深層学習の画像認識モデルを複数組み合わせて用いることで、ミトコンド リアの動的形状の評価を行う手法を開発した.ミトコンドリアは合体と分裂を繰り返しな がらネットワークを形成しているが、この動的な形状の変化を抽出し評価している.

また、田中[9]や執筆者の卒業論文[10]では、深層学習ネットワーク CDeep3M(2.2.3 で後述) と画像処理を用いたミトコンドリアの自動抽出手法を開発し、SBEM 画像から小器官ミト コンドリアの実形状 3D モデルの作成が可能となっている. 抽出のフローは以下の図 1.1 の ようになっている. 小器官を手書きで抽出した画像を教師画像として深層学習により入力 画像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を行う. そして、 2 つの検出結果を組み合わせて画像処理によりモデルを作成する. 深層学習によって広範囲 にわたる微細構造の抽出を可能としている. また、深層学習のみではミトコンドリア個々の 境界を精度よく検出することはできないため、画像処理によってミトコンドリアの分割を 行っている.

強度を用いた A.Hussain[7]の手法や他の深層学習を用いた手法と同様,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大幅に効率化されている.

また,個々の小器官を区別した三次元モデル(図 1.2)が作成できるという点が大きな利点 である.一方で,この手法を用いるにあたって,どれほどの教師画像を要するのか,他の個 体の細胞画像に対する適用はどれほど可能なのか,どれほどの精度を出すことができるの かといった議論は行われていない.また,3次元モデルとしての評価は十分にはされていな い.



入力画像(SEM)



境界検出

図 1.1 手法の概要



モデル作成



図 1.2 作成されたミトコンドリアモデル 2 種類の細胞においてミトコンドリアが抽出された. 各個体が異なる色によって区別されている.

## 1.2.4 心筋細胞モデルを用いた現象の再現

小器官の形状や役割を再現した心筋細胞のモデルを用いて細胞内の現象を再現するシミ ュレーションを行う先行研究について述べる.

Colman[11]は、ヒツジの心筋細胞の SBEM 画像から SR やT 管を抽出することで実形状の 三次元構造を構築し、カルシウムイオンの反応拡散のシミュレーションを行った.正常状態 及び病態両方での反応拡散の再現がなされている.また、細胞の簡易モデルの結果との比較 を行い、簡易モデルよりも高い濃度勾配が生じていることから、構造の機能への影響を評価 している.

波田野[12]は、図 1.3 のような心筋細胞微細構造の有限要素モデルを用いて、力学的現象、 電気生理現象、代謝現象を連成した解析を行った.細胞内の物質の濃度変化や心筋細胞の収 縮現象は実験値と一致しており、心筋細胞の収縮を再現した解析を実現した.

橋本[13]は、 SBEM 画像から作成された実形状モデルに対して電気生理的な解析を行った. T 管や SR といった他の小器官と比較して小さい小器官も含めた細胞内小器官全てをメッシングしたモデルを使用したことによって、メッシュの大きさにばらつきが生じ、計算量の観点から現象を再現するのに十分といえる解析を行うことができなかった.

望月[14]は橋本の解析を踏まえて、体積の小さい小器官である T 管や SR を三次元要素で はなく節点及び三角要素として扱うことによって計算負荷を軽減し、現象を再現するのに 十分な時間の力学電気生理連成解析を実現した.使用したモデルを図 1.4 に示す.一方で、 モデル範囲が十分に大きくなく、境界条件の定義が課題とされた.



図 1.3 波田野[12]のモデル





図 1.4 望月[14]のモデル SBEM 細胞断面画像(左),実形状モデル(右) ンドリア(ピンク) 筋原線維(水) 細胞膜(黄) 工管(黄緑)

ミトコンドリア(ピンク), 筋原線維(水), 細胞膜(黄), T管(黄緑), SR(赤) T管と SR は実形状モデルでは節点及び三角要素として表現されている.

# 1.3 研究の目的

本研究では,SBEM 画像を起点とした実形状のモデルを用いて,心筋細胞の収縮現象を 再現する解析を行うことを目的とする.そのために,深層学習を用いた SBEM 画像に基づ く心筋細胞微細構造の実形状モデルの作成,モデルを用いた心筋細胞の力学電気生理連成 解析を行う.

# 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に関する概要を述べる.

第3章では、深層学習に基づくミトコンドリア抽出処理の手法とその精度の評価及び三次 元形状の評価について述べる.

第4章では、画像処理に基づくT管抽出処理について述べる.

第5章では、作成した小器官モデルを用いた力学生理連成解析用の細胞モデルの作成手法 及び解析の内容について述べる.

第6章では、本研究の結論と今後の課題について述べる.

# 2 微細構造モデル作成に関する基本的事項

# 2.1 心筋細胞

# 2.1.1 心筋細胞の微細構造

成人の心臓において、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いる.心筋細胞は心臓全体の収縮運動の原動力となっており、生理的に自発的な拍動を行う不随意筋に分類される.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.



図 2.1 心筋細胞模式図[12]

心筋細胞内の小器官の役割や形態の特徴について述べる[15].

筋原線維は筋肉の微細構造の構成単位であり、細胞の長軸方向にほぼ並行して存在する 多数の微小線維である.筋原線維の模式図を図 2.2 に示す.筋原線維内部は、たんぱく質の 分子集合体のアクチン及びミオシンと呼ばれる 2 種類のフィラメントが筋線維方向に繰り 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.また、A 帯、I 帯、H 帯と呼ばれる箇所は図のようになっている. 筋節長はおよそ 1~2μm 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.



図 2.2 筋原線維模式図

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.様々な形のものが存在するが、筋原線維に沿った楕円形のものが多い.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、カルシウムイオン(*Ca*<sup>2+</sup>)を貯蔵することで細胞内の濃度を調整するなどの役割を持つ.また、個体をより良い状態に保つために細胞の死を管理するアポトーシスという役割も持つ

T管(横行小管)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.細胞表面から陥没しており,細胞外液で満たされている.T管は細胞全体に 広がっており,細胞の活動電位を細胞内に伝達することで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 管に向かい合って存在する Junctional SR(JSR)と,その他の箇所で網状に存在する 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.

### 2.1.2 興奮収縮連関

心筋の収縮・弛緩機構について述べる[16].

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、 $Ca^{2+}$ を放出する. その $Ca^{2+}$ が JSR の RyR を開き、多くの $Ca^{2+}$ が細胞質に放出される.この作用機構を $Ca^{2+}$ 誘発性 $Ca^{2+}$ 放出という. $Ca^{2+}$ がアクチンフィラメント上にあるトロポニンと呼ばれるタンパ ク質に結合すると,通常時には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線維は収縮する.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*Ca<sup>2+</sup>*濃度の高まりから*Ca<sup>2+</sup>*はNSR に取り込まれ,細胞外へ放出される.細胞質*Ca<sup>2+</sup>*濃度が低下してトロポニンから*Ca<sup>2+</sup>*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,筋線維は弛緩する.

### 2.1.3 心筋細胞の SBF-SEM 画像

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,様々な手法が存在する.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[17](SBEM, 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 SBEM 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. SBEM 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.

心筋細胞の SBEM 画像に関して述べる.心筋細胞断面の SBEM 画像の例を以下の図 2.3 に示す.筋原線維は図の縦方向を線維方向として存在しており,径の太いミオシンフィラメントからなる A 帯は強度が小さく,径の細いアクチンフィラメントからなる I 帯は強度が大きい.I帯内の線状の箇所が Z 帯である.筋原線維の線維方向に沿ってミトコンドリアが並んでおり,その間で Z 帯の近辺に T 管が分布している.

心筋細胞の SBEM 画像全体の強度分布は図 2.4 のように二峰性を有する. 一つ目のピー クはミトコンドリア,二つ目のピークは筋原線維によって主に構成されている. 図 2.4 の ように細胞外の箇所が写っている場合,三つ目のピークを形成する場合がある.



図 2.3 心筋細胞 SBEM 画像(左). 1辺 14µm. 図中央は細胞外領域. 赤線部を拡大した画像(右). ミトコンドリア(M), 筋原線維(MF), T 管(T).



図 2.4 図の心筋細胞 SBEM 画像の強度分布. 横軸が強度(0-255),縦軸が頻度

2.2 深層学習

# 2.2.1 深層学習概要

深層学習のアルゴリズムの概要について述べる[18].

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 2.5 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入力として,活性化関数を通じ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, 基本的に負の値が用いられないため,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*<sub>k</sub>はk番目のニューロンへの入力(入力の総数はn),*y*<sub>k</sub>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 おり,機械学習の目的に応じて選択的に使用される.

$$y_k = \frac{\exp(a_k)}{\sum_{i=1}^n \exp(a_i)}$$
(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,ラベルは出力データと同様の正解を示すデータを指 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.

学習では、活性化関数を通じて得られる最終的な出力と正解となる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 2.2, 2.3 で表現される. y<sub>k</sub>は NN の出力, t<sub>k</sub>は教師データを表す.

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

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

以上が機械学習の概要となる. 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 層を持つ学習が深層学習と呼ばれる.

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)がある. 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すべてのニューロン間で結合がある構造(全結合層)に畳 み込み層とプーリング層と呼ばれる層を加えたものである.畳み込み層及びプーリング層 の役割や特徴について述べる.

畳み込み層では、畳み込み演算により画像をピクセル単位ではなく一定の広がりをもっ て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 2.6 に挙げる.畳み込み演 算では、カーネルと呼ばれるフィルタのピクセルと入力行列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 2.6 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.畳み込みはカーネルと似た性質を持つ領域を抽出しており、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 2.6 畳み込み演算

プーリング層は、特徴マップを局所ごとに代表地にまとめることによって、サイズを小さ

くして特徴の抽象度を1段階高める役割を持つ. 代表的なプーリングには, 図 2.7 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 プーリングがある. 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 2.7 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として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[19]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[20]は、学習時に隠れ層のニューロンをランダムに選択し、選択され た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.

## 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を人間が 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.しかしながら,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 いようなものについても判断が可能となる.深層学習の中でどのような特徴量を抽出して いるのかを完全には把握できないという問題があるが、人間と並ぶかそれ以上の精度での 検出を可能とする.

### 2.2.3 CDeep3M

CDeep3M[21]は、細胞の光学顕微鏡、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 用データセットの教師としての強化を行った後に、3通りに学習を行う.学習用データの強 化は、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 よって行われている.作成された 3 つ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て最終的な結果を出力する.

本研究では、走査型電子顕微鏡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の二値画像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、 CDeep3M 内に用意されているモデル(脳細胞のミトコンドリアのデータセット 80 組を反 復回数 30000 回で学習したモデル)を使用している.

# 3 深層学習を用いたミトコンドリアモデルの

構築

# 3.1 緒言

ここでは、先行研究[9,10]と同様の手法で、先行研究では扱われなかった新たな細胞画像 を含めた3種類の細胞画像に対して、ミトコンドリアの実形状モデル構築を行う. ミトコ ンドリアの形状を SBEM 画像から深層学習を用いて抽出し、画像処理を用いて分割処理を 行う. 先行研究では、教師数の抽出精度への影響の評価や小器官のミトコンドリアの三次 元形状の評価が十分になされていない. したがって、これらの評価を行い形状抽出手法の 信頼性・妥当性を示すとともに、新たに他の細胞の形状抽出に適用する際の指針を示す.

# 3.2 抽出手法

SBEM 画像からの抽出は基本的に田中・染谷の手法[9,10]に準ずる.変更点を追記する形で抽出手法を述べていく.

## 3.2.1 SBEM 画像の準備

ミトコンドリアの抽出には3種類の心筋細胞SBEM 画像を使用する.先行研究で使用した生後4か月の正常なマウス[22]の心室心筋細胞のSBEM 画像(細胞A:400枚,細胞B:690枚)のほか,筋の運動を生理的に制御する役割を持つMLP(Muscle Lim Protein)が欠落した心不全のマウス[23]の心筋細胞SBEM 画像(細胞C:550枚)を使用する.全て4096×4096 画素の画像で,細胞A及びBは1 画素の大きさ3.5nm,スライス間隔70 nm,細胞Cは1 画素の大きさ4.7 nm,スライス間隔70 nmであった.なお,これらの心筋細胞SBEM 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.

抽出の前処理として、画像処理のコストを削減するために ImageMagick[24]を用いて 1024 × 1024 にダウンサンプリングをした.

また,一部のセグメンテーションでは以下の強度調節を行った.これは,異なる細胞画像 および連続する細胞画像内での撮影環境の差を極力小さくすることを目的としている.強 度調節の有無の精度への影響を評価する.手法を以下に述べる.

画像の強度分布内の 2 つのピークの位置を学習用教師画像全てで測定し、各画像の 2 つ のピークの平均*Icenter<sub>k</sub>*, *Icenter<sub>k</sub>*の平均値 *Imean* を算出する. 全ての入力画像に対しても 2 つのピークの平均*Icenter<sub>k</sub>*を算出し、各*Icenter<sub>k</sub>が Imean* に一致するようにピクセル強度 全体をシフトさせた.

強度調節の例を次の図 3.1 に示す. Imean は 175.25 として調節している.



図 3.1 強度調節の例 調節前(上),調節後(下). *Icenter<sub>k</sub>を Imean*=175.25 に一致するように強度分布全体を シフトさせている.

# 3.2.2 教師データの作成

SBEM 画像を学習用画像, SBEM 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を行う. ラベル作成には, 3D モデルの作成や観測に特化したオープ ンソースプログラム IMOD[25]を使用して, ミトコンドリアの輪郭を一つ一つなぞった. 対 象検出のラベルは輪郭の内部を白(強度 1), それ以外を黒(強度 0)とし, 輪郭検出のラベルは 輪郭のみを白とした. データセットの一例を図 2.7 に示す. データセットは, 先行研究[9,10] ですでに作成されているものに加えて新たに作成し, 細胞 A50 組, 細胞 B30 組を使用する.





図 3.2 作成したミトコンドリアのデータセットの1例 学習用 SBEM 画像(上),対象ラベル画像(左),輪郭ラベル画像(右). ラベルは可視化のために 0-255 の二値で表示されている.

# 3.2.3 深層学習による小器官抽出

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く、大まかな輪郭がこの後の分 割処理に必要となるため、CDeep3M の深層学習モデルを用いて小器官の対象及び輪郭のセ グメンテーションを行う.対象の検出は、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.追加学習に使用する教師数 は、先行研究で実施した条件に加えて以下の表のような条件で行った.学習回数は 3000 回 とした.輪郭の検出は、転移学習は使用せず、学習回数は 20000 回とした.学習回数は先行

# 表 1 学習条件

全て強度調節は行っていない

太字は先行研究[10]で行われた条件

	ラベル数		
抽出対象	細胞 A	細胞 B	
細胞 A	0	0	
	1		
	3		
	5		
	7		
	9		
	10		
	20		
	30		
	40		
	50		
細胞 B	0	0	
		1	
		3	
		5	
		7	
		9	
		10	
		15	
		20	
		25	
	10	10	
	20	20	
	50	0	
		5	
		10	
		15	
		20	
細胞 C	50	30	

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.

## 3.2.4 個体の分割処理

深層学習によりセグメンテーション結果から、小器官同士の境界を作成し分割を行う. 分割処理[9]の手順は以下のようになっている.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と輪郭の結果を2値化し,差をとることで図3.3 のような大まかな分割画像を作成する.



図 3.3 対象と輪郭の差分を取った分割画像

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 用して各小器官を切り離し,各小器官の中心となる領域(以降,核と呼ぶ)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.

$$G(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}}$$
(3.1)

核の抽出を行った後に、核それぞれに別々のマークをつけることで図 3.4 のように核を 識別する.



図 3.4 ガウスぼかし(左),2 値化(中),核の識別(右)

マーク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次元方向に対して同様に行うことで、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3.5のように分割画像が作成される.



図 3.5 手書きラベル(左), 2次元分割画像(中), 3次元分割画像(右)

# 3.3 評価方法

# 3.3.1 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,分類の例となる図 3.6 を以下に示す.

	ラベルが正	ラベルが負		
山力が正	真陽性	偽陽性		
	TP:True Positive	FP:False Positive		
山力が有	偽陰性	真陰性		
山刀が東	FN:False Negative	TN:True Negative		

表 2 結果の分類



False Positive False Negative

図 3.6 セグメンテーション結果の分類の例

## 3.3.2 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), IoU(Intersection over Union)の4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 3.2, 3.3 の通りである.

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$
(3.2)

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$
(3.3)

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 3.4, 3.5 の通りである.

$$\frac{1}{F-score} = \frac{1}{2} \times \left(\frac{1}{Precision} + \frac{1}{Recall}\right)$$
(3.4)

$$F - score = \frac{2 \times Recall \times Precision}{Recall + Precision}$$
$$= \frac{2 \times TP}{2 \times TP + FP + FN}$$
(3.5)

IoUは以下の式 3.6 で計算される.

$$IoU = \frac{TP}{TP + FP + FN}$$
(3.6)

F値は検知したいものが検知されているかを評価し, IoU は輪郭の漏れやはみだしを厳密 に評価する.これらの4種類の指標を本研究では使用する.

## 3.3.3 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.本研究では,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におけ る F 値を計算し, F 値が最大となったしきい値での各指標を評価の対象とする.

### 3.3.4 幾何学的形状の評価

分割処理後に作成したミトコンドリアの三次元形状を評価するために、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主軸の線維方向に対する配向性,短軸長を算出 する.これらの値を先行研究の結果[2,3]と比較することで,抽出手法の妥当性の評価及びミ トコンドリアの形状の評価を行う.

離心率と配向性を算出する際には、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.長球の形状を図 3.7 に示し、長球近似の イメージを図 3.8 に示す.以下、具体的な手法を述べる.



図 3.8 長球近似

まず、ミトコンドリアを構成するすべての節点の座標を用いて、最小二乗法により主軸を 求める.全ての節点と直線の距離が最小となるような直線を求める.

次に、求めた主軸の方向ベクトルが x 軸の向きと重なるようにミトコンドリア節点の座 標を回転させる. 図 3.9 のようにまず zx 平面上に主軸が乗るように 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+ $\beta$ 回転させる.



#### 図 3.9 主軸回転

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.

$$R_z = \begin{bmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$
(3.7)

$$R_{y} = \begin{bmatrix} \cos \beta & 0 & \sin \beta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \beta & 0 & \cos \beta \end{bmatrix}$$
(3.8)

$$R_y \times R_z \times \begin{pmatrix} a \\ b \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} t \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$
 (t は任意の実数) (3.9)

$$\therefore \begin{cases} -a\sin\alpha + b\cos\alpha = 0\\ -a\sin\beta\cos\alpha - b\sin\alpha\sin\beta + \cos\beta = 0 \end{cases}$$
(3.10)

$$\therefore \begin{cases} \alpha = \tan^{-1} \frac{b}{a} \\ \beta = \tan^{-1} \frac{1}{a \cos \alpha + b \sin \alpha} \end{cases}$$
(3.11)

こうして得られたα,βを用いてミトコンドリアの節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 3.12 の 形になるような a 及び b を求めて長球近似を行う.長球の長辺を a、短辺を b としている.

$$\left(\frac{x}{a}\right)^2 + \left(\frac{y}{b}\right)^2 + \left(\frac{z}{b}\right)^2 = 1$$
(3.12)

こうして求まった長軸及び短軸の長さから、以下の式に基づき離心率 e を算出する.

$$e = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2} \tag{3.13}$$

また、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0を配向性として求める.筋原線維の線維方向は、細胞全体の中から無作為に抽出した2,3か所のZ帯を手書きで抽出し、Z帯面の法線ベクトルの平均をとることで決定している.

なお,作成された細胞モデルの境界上に存在するミトコンドリアは断面において分断さ れており,正しい形状では抽出されていない.したがって,三次元形状の評価は,全体が 完全にモデルの中に含まれているミトコンドリアに対してのみ行った.

# 3.4 結果

## 3.4.1 深層学習によるミトコンドリア抽出

深層学習による抽出結果の精度は以下の表のようになった.

▲子は元11切九[5] €114240に米件						
	ラベル数					
抽出対象	細胞 A	細胞 B	適合率	再現率	F 値	IoU
細胞 A	0	0	0.132	1.000	0.232	0.132
	1		0.921	0.944	0.932	0.874
	3		0.925	0.958	0.941	0.889
	5		0.925	0.960	0.942	0.891
	7		0.926	0.959	0.942	0.891
	9		0.929	0.956	0.942	0.890
	10		0.929	0.958	0.943	0.892
	20		0.933	0.953	0.943	0.892
	30		0.935	0.956	0.945	0.895
	40		0.938	0.958	0.945	0.896
	50		0.932	0.958	0.945	0.896
細胞 B	0	0	0.323	0.837	0.404	0.270
		1	0.584	0.684	0.623	0.506
		3	0.574	0.873	0.655	0.543
		5	0.879	0.938	0.907	0.930
		7	0.890	0.941	0.915	0.843
		9	0.894	0.941	0.917	0.846
		10	0.898	0.945	0.918	0.848
		15	0.900	0.945	0.922	0.855
		20	0.878	0.954	0.915	0.843
		25	0.896	0.944	0.920	0.851
	10	10	0.837	0.937	0.884	0.792
	20	20	0.833	0.945	0.885	0.794
	50	0	0.466	0.625	0.534	0.364
		5	0.414	0.635	0.501	0.334
		10	0.533	0.739	0.620	0.449
		15	0.884	0.921	0.902	0.822
		20	0.912	0.932	0.922	0.855
細胞 C	50	30	0.914	0.944	0.929	0.867

## 表 3 深層学習によるミトコンドリア抽出結果 全て強度調節は行っていない 大字は失行研究ににで行われた条件



図 3.10 教師数の F 値への影響

細胞 A は転移学習元の脳細胞内のミトコンドリアによる学習データのみでは抽出できな かったが、細胞 A の教師を 1 枚加えると F 値 0.932 という高い精度での抽出が可能となっ た.教師を 5 枚とすると F 値は 0.942 と大きくなった.それ以降は教師枚数が増加しても精 度の上昇は大きくは見られず、0.945 程度で収束した(図赤線).細胞 B も細胞 A と同様に、 細胞 B 由来の教師を 5 枚加えると F 値 0.907 という高い精度での抽出が可能となり、それ 以降は教師枚数が増加しても精度は上昇せず 0.92 程度で収束した(青線).

細胞 B に対して細胞 A の教師を使用した場合,ほとんど小器官を抽出することができなかったが,細胞 A の教師に細胞 B の教師を追加して学習を行うと精度は大きくなり,15~20枚程度で単体の教師を使用した場合と同等程度の F 値 0.9 という精度で抽出された(紫線).

また,細胞 A 及び細胞 B の教師を使用して新たな細胞 C を抽出したところ, F 値 0.929 という高い精度でミトコンドリアを抽出することができた.

### 3.4.2 SBEM 画像の強度調節

画像の強度調節を行った際の結果を示す. 細胞 B の結果は, 強度調節がない際の抽出では 他のスライスに比べて精度よく抽出できなかったスライスの F 値を示している. 細胞 C の 結果は, 表 4 の細胞 C の評価に使用したスライスでの値を示している. 強度調節を行うこ とによって, 細胞全体の精度が上昇するほか, 特に強度調節なしでは抽出できていなかった 領域も抽出することができるようになった.細胞 B の抽出の様子は以下の図 3.11 のようになった.

	ラベ	ル数			
抽出対象	細胞 A 細胞		強度	F 値	
			調節		
細胞 B	50	20		0.512(i)	
	50	20	0	0.915( ii )	
細胞 C	50	30		0.929	
	50	30	0	0.932	

表 4 強度調節の有無の抽出精度への影響



図 3.11 細胞 B の抽出結果 左から, SBEM 画像,抽出結果, SBEM 画像の強度分布. (i)(ii)は表 3 内の条件に対応 している.

## 3.4.3 ミトコンドリアの三次元形状

ミトコンドリアの三次元形状の結果について述べる.抽出されたミトコンドリアの個数 及び体積分布をそれぞれ以下の表 5,図 3.12 に示す.横軸が体積,縦軸が相対度数となっ ている. 細胞 A,B では 0-0.2  $\mu m^3$ のミトコンドリアが大幅に占める一方で、細胞 C は 0.2-0.4  $\mu m^3$ をピークとして広く分布している.

	モデル寸法(µm <sup>3</sup> )	個数(境界上にない)	平均体積(μm <sup>3</sup> )	
細胞 A(正常)	$14 \times 14 \times 28$	601	0.78	
細胞 B(正常)	$14 \times 14 \times 48.3$	1714		
細胞 C(MPLKO)	19.3×19.3×38.5	2551	0.72	

表 5 ミトコンドリアのモデル内の個数及び平均体積



図 3.12 ミトコンドリアの体積の分布

ミトコンドリアを長球近似した際の離心率及び配向性の分布を以下の図 3.13, 図 3.14 に 示す. 横軸が離心率及び主軸と線維方向のなす角度,縦軸が度数となっている.

離心率に関しては、3種類全ての細胞で離心率が0.7を超えるミトコンドリアが70%以上 を占める結果となった. Rog-Zielinska[2]の手書き抽出による結果では、離心率が0.7を超え るミトコンドリアは約68%存在し、分布の傾向は定性的に一致している.

配向性に関しては,3種類すべての細胞において,約60%のミトコンドリアが線維方向 との成す角度が30度より小さくなっている. Rog-Zielinska[2]の結果では,線維方向との成 す角度が30度より小さいミトコンドリアは約73%存在しており,また,0-10度のミトコ ンドリアが最も多く存在している.本研究の結果は、Rog-Zielinska[2]の結果に比べてピー クが10度右にずれた分布となっている.



図 3.13 ミトコンドリアの離心率の分布



図 3.14 ミトコンドリアの配向性の分布

ミトコンドリアを近似した長球の短軸長の分布を図 3.15 に示す. 横軸が短軸長(μm), 縦 軸が度数である. CellA,B では頻度のピークが 0.2-0.3 μm にあり, CellC ではピークが 0.4-0.5 μm にある. CellC は CellA,B よりやや短軸が大きい傾向を持つ. Tsushima[3]の結果では, 短軸長のレンジは 0.2 μm から 0.8 μm で, 0.4-0.5 μm にピークを持つ. 本研究の結果は文献 値の結果から大きく外れてはいない.





図 3.15 ミトコンドリアの短軸長の分布

# 3.5 考察

## 3.5.1 教師画像の種類の抽出精度への影響

細胞 A の教師のみによる学習で細胞 B を抽出することはできなかった. これは, 細胞 A と細胞 B の強度分布の傾向が異なることが考えられる. 以下の図 3.16 は細胞 A 及び B の SBEM 画像及びその強度分布の一例である. ともにミトコンドリア及び筋原線維による 2 つ のピークを持つが, 2 つのピークの幅は細胞 A と細胞 B とで異なる. この傾向は細胞全体 を通じて共通であり, この要素が異なる細胞の教師による学習の精度に影響を及ぼしている可能性がある.

細胞 A 及び細胞 B の教師により細胞 C のミトコンドリアを高い精度で抽出すること ができた.これは、細胞 C の強度分布が細胞 A の強度分布に似た傾向を持つ、つまり、2 つのピークの幅が近いことによると考えられる.また、細胞 A 及び B の縮尺は1 ピクセル あたり 14 nmである一方で、細胞 C の縮尺は1 ピクセルあたり 18.8nmであった.画像の スケールは異なったが、細胞 C の抽出は可能であった.このことから、深層学習による抽 出においてミトコンドリアの大きさから判断されている可能性は低いと示唆される.

新たな細胞に対してこの抽出手法を行う際には、その細胞の強度分布の2ピークの幅が 細胞 A または細胞 B に近い場合は既存の教師による抽出が可能であり、そうでない場合 は、5~10 枚程度の教師画像を新たな細胞から作成し追加して学習を行うことで抽出ができ ると推測される.





細胞 A の SBEM 画像(A-i)及び i の強度分布(A-ii)と、細胞 B の SBEM 画像(B-i)及び i の強度分布(B-ii). 強度分布は横軸が強度(100-200)、縦軸が度数.

## 3.5.2 強度調節の抽出精度への影響

細胞 B に関して,強度調節によって細胞全体として精度が向上したほか,図 3.11 の断 面画像及びその近辺の精度の大幅な向上を可能とした.図 3.11 の断面画像近辺の領域は, 強度調節を行わない場合には高い精度で抽出することが出来ていなかった.これは図のス ライス近辺の SBEM 画像の強度が他の領域の画像強度に比べて全体的に小さいことによる と推測され,強度調節により2つのピークの強度の位置を教師画像と大まかに合わせるこ とが抽出精度向上に大きく寄与しており,強度調節によって試料の個体差及び撮影環境な どによる画像強度の差を小さくすることができると考えられる.

図 3.11 の画像内には, 強度調節を行ったことによってミトコンドリアである確率がやや 大きくなっている筋原線維の箇所が見受けられる. このスライス近辺の画像強度は二峰性 を持つが,他の領域に比べて2つのピークの感覚が極端に小さいことによると推測される. これは,強度に二峰性が見られない,つまりミトコンドリアと筋原線維が近い強度値をもつ ことでピークが1つになっている場合にはミトコンドリアのみの抽出が困難になることを 示唆しており,安定した撮影環境が重要となる.

強度調節を細胞 C に対して適用した際にも、細胞 B の結果と同様に細胞全体として精度 が向上したほか、局所的に抽出できていなかった領域の抽出も可能とした.このことは、強 度抽出の手法は教師に使用していない新たな細胞に対しても適用可能であるということが 明確である.

## 3.5.3 ミトコンドリア三次元形状の妥当性

以下の図 3.17 は抽出された領域の 3D モデルの様子である.また,図 3.18,図 3.19, 図 3.20 は、教師画像を作成するために手書きで小器官を抽出した領域内部のミトコンド リアの体積、離心率及び配向性の分布を示している.境界内に全体が収まっているミトコ ンドリア 147 個を対象としており、細胞 B 内のミトコンドリアの約 5%に相当する.

図 3.12 と図 3.18 を比較すると,自動抽出を行った領域は 0-0.2 µm<sup>3</sup>の範囲に大きなピ ークが存在する一方で,手書き抽出による領域は大きなピークはなく全体に分布が広がっ ている.この理由としては 2 点考えられる.まず 1 点目は,手書き抽出を行った領域には 小器官の形状が整った領域が選択されているという点である.教師画像に使用する領域で あったことから,ヒューマンエラーが少なくなるようにミトコンドリアが大きく単調な領 域が選択されている.そして 2 点目は,ミトコンドリアが画像処理による分割の際に過分 割が生じ、体積が小さく抽出されている可能性がある点である.

図 3.13, 図 3.14 と図 3.19, 図 3.20 をそれぞれ比較すると,離心率及び配向性は定性的に分布の形状が一致しており,自動抽出によって形状が正しく抽出されていることがわかる.



図 3.17 手書きによって抽出された領域の 3D モデル



図 3.18 手書きで抽出されたミトコンドリアの体積分布



図 3.19 手書きで抽出されたミトコンドリアの離心率分布



図 3.20 手書きで抽出されたミトコンドリアの配向性分布

以下の図 3.21 は、細胞 A 内の一部のミトコンドリア及び対応する長軸を可視化したも のである. 3.4.3 において、「配向性に関しては、3 種類すべての細胞で約 60%のミトコン ドリアが線維方向との成す角度が 30 度より小さくなっている.」と述べたが、この図から も視覚的に 30 度以下のミトコンドリアが支配的であることが確認できる. Rog-Zielinska[2] の結果と本研究の頻度分布のピークの位置にずれが生じた原因としては、筋原線維のうね りが考えられる.本研究では各細胞に対して線維方向を一意に定めているが、細胞内で筋 原線維は曲がっている箇所もあり(図 3.22 参照)、基準としている線維方向が正しい線維 方向を示すことができているとは限らない.したがって、0-10 度の区間にピークが出なか ったと考えられる.



図 3.21 ミトコンドリアの 3D 図と長軸 白が線維方向に対して 0-30 度のミトコンドリア,水色が 30-60 度,青が 60-90 度を示す.



図 3.22 筋原線維が曲がっている箇所の例(細胞 B)

## 3.5.4 病態のマウスと正常なマウスとの比較

3.4.3 の結果から,正常な細胞 A,B と MLP がノックアウトしている心不全の細胞 C の形状の差について考察する.

離心率, 短軸長においては, 細胞 A,B と細胞 C との間に大きな差は見受けられなかった.

一方で、体積においては、細胞 C は平均値に近いミトコンドリアが多く存在したが、細胞 A,B は平均値から離れた極端に小さいミトコンドリアと大きいミトコンドリアの割合が細 胞 C に比べて多かった.したがって、ミトコンドリアの基本形状は病気の有無に関わらず 一定の離心率の長球となるが、その大きさに特徴が出ると考えられる.ミトコンドリアは絶 えず合体と分離を繰り返していることが知られているが[8]、正常な細胞は病態の細胞より も、小さく分離して大きく合体しようとする傾向にあることが推測される.

また,配向性の分布においては細胞 A,B と細胞 C との間に有意な差は見受けられない. したがって,ミトコンドリアの配向性は病態の細胞と正常な細胞との間に変化はないと結 論付けられる.

# 4 画像処理を用いた T 管の 3D モデル構築

# 4.1 緒言

T管は、収縮のきっかけとなる電気刺激を細胞内に伝達するという重要な役割を持つ. ミトコンドリアや筋原線維と比較するとT管の占める体積は小さく、画像内を占める割合 も低い一方で、高い強度を持つ傾向にある.こうした強度や大きさという特徴を基に、画 像処理によって抽出を行い、三次元モデルを構築する.

# 4.2 抽出手法

抽出の主な流れは以下の図のようになっている.

抽出には、細胞の SBEM 画像(A)と、ミトコンドリアと筋原線維を3章の手法によって抽出したセグメンテーション結果の画像(A')を使用する.

まず,細胞の SBEM 画像の強度分布を 0~255 の間で正規化し,しきい値 250 による二値 化を行う(B1).これによって,T管が存在する可能性の高い領域を抽出している.同時に, 正規化した画像に対して Sobel フィルタを用いたエッジ検出を行う(B2).これらの工程は, 画像処理に特化したアプリケーション ImageJ[25,26]を用いたコーディングによって行った.

次に, B1 と B2 の結果を重ね合わせる(C). その際, ミトコンドリアや筋原線維の領域内 にある T 管存在領域を消去する.これによって, I 帯などの T 管以外の強度の高い領域の誤 抽出を防ぐ.

最後に、T 管の可能性のある領域を膨張させる要領でエッジの範囲内で塗りつぶすことで T 管を抽出する.なお、この領域はエッジの分やや小さく抽出されているので、最後に2 ピ クセル膨張させる.また、一定の面積以上に広がって塗りつぶされた箇所は T 管ではない (主に細胞外領域)ので、ピクセル面積でしきい値を設けることで選別を行った.

本研究では、ミトコンドリアのセグメンテーション結果として3章で抽出された結果を、 筋原線維のセグメンテーション結果として小沢[27]によって抽出された結果を使用した.

抽出の評価としては,T管の正確な判断をすることはほとんど不可能であるため,形状の 定性的な評価のみを行う.



図 4.1 T 管抽出手法のフロー

# 4.3 結果と考察

細胞 A では誤抽出も少なく,高い精度で抽出を行うことができた一方で,細胞 B では 誤抽出が多かった.抽出結果を以下の図 4.2,図 4.3 に示す.抽出された領域が橙色に示さ れている.図 4.3 において,右側の領域は筋原線維であるが T 管として抽出されてしまっ ている.この原因としては,細胞 B の強度分布における筋原線維のもつ強度値と T 管の強 度値が近い値を持つためであると考えられる.

また、断面上では抽出できているように見えるが、三次元モデルからはそれぞれの T 管 はつながっていないことがわかる(図 4.4). 従来の T 管は、動物種によって異なるが、細胞 内の筋原線維やミトコンドリアの間で網目状に張り巡らされており、Z 帯付近などで局所的 に太い箇所や球形をしている[4,5]. 本手法による抽出では、線維方向に細くのびている領域 も存在したが、Z 帯付近の球状の領域を中心とした抽出に留まっており、全体としてつなが って網目状に抽出されることはなかった. T 管の細い領域を抽出するためには、3 次元形状 として抽出できた領域から、つながっている細い T 管の探索を行い、さらなる抽出を行う 必要があると考えられる.



図 4.2 細胞AのT管抽出結果例



図 4.3 細胞 BのT 管抽出結果例



図 4.4 細胞AのT管3次元モデルの一部 境界にはSBEM画像を表示.繋がっていないT管の領域は別のオブジェクトとみなし,異 なる色で表示されている.

# 5 力学電気生理連成解析

# 5.1 緒言

第3章で深層学習を用いて作成したミトコンドリア,筋原線維,細胞質からなる細胞モデルと画像処理によって第4章で抽出を行ったT管のモデルを使用して,力学電気生理連成解析を行い,心筋細胞の収縮現象を再現する.連成解析は,望月[14]の手法に倣って行う.

## 5.2 解析手法

## 5.2.1 細胞モデルのメッシュ作成

細胞モデルのメッシュの作成手法について、小器官の種類ごとに述べる.

### ミトコンドリア、筋原線維、細胞質基質、細胞外領域

第3章で行った抽出によって構築された細胞モデル内で、細胞内小器官が密につまった 領域を選択し、線維方向が軸方向に一致するような領域を切り出す.この領域に対して、 Simpleware Software を用いてテトラメッシュを作成する.その際、異なるオブジェクトが接 する面では節点を共有する形で小器官の各個体のメッシュを作成する.本研究では、株式会 社 JSOL の宮崎様にメッシュを作成していただいた.

T管

T管はミトコンドリアや筋原線維と比べて体積が小さく,三次元要素とすると非常に細か いメッシュとなり計算負荷を大きくすることから,望月[14]の手法と同様にT管を節点と仮 定する.第4章で行った抽出によって構築されたT管モデルに対して,誤抽出の領域の消 去など修正を加えた後,ピクセル単位での画像処理手法の1つである closing 処理[28]によ って細かい穴を塞ぎ,表面を滑らかにした.表面に三角形のシェル要素を作成し,各要素の 重心に最近傍の細胞質に含まれる節点をT管の節点とした.T管の節点数は635である.

#### 細胞膜

上述の通り作成された細胞モデルにおいて、細胞外のメッシュと細胞内のメッシュが接 している領域に三角要素を作成することで細胞膜モデルを定義した.

SR

T 管と同様の理由から三次元要素を作成することはできないため,NSR はシェル要素, JSR は節点とした.NSR に関しては,筋原線維の表面に三角要素を作成することで定義した.JSR に関しては,望月[14]は手書きによって抽出されている dyad (T 管と JSR との間に存在する空間)の表面を JSR として定義している.しかし,本研究では SBEM 画像から dyad は抽出していないので,T管として定義される各節点から最近傍なNSR上の節点をJSRとして定義した.NSRの要素数は25786,JSRの節点数は486である.JSR節点数がT管節点数から減少するのは,対応するJSR節点が複数のT管節点の間で共通することがあるためである.

メッシュの様子を以下の図 5.1 から図 5.6 に示す. 青色の領域が筋原線維, ピンク色の領 域がミトコンドリア,緑色の領域が細胞質,黄色の領域が細胞膜,灰色の領域が細胞外領域 である. モデルの大きさは 9.87 µm×11.34 µm×11.37 µm,節点数は 93719,要素数は 571120 である.



図 5.1 有限要素解析モデル



図 5.2 有限要素解析モデル(細胞外領域なし)

各小器官の形状を以下の図 5.3~図 5.6 に示す.



図 5.3 ミトコンドリアの形状

図 5.4 細胞質の形状



図 5.5 筋原線維の形状

図 5.6 NSR の形状

## 5.2.2 電気生理現象の記述

本研究で用いた解析用プログラムは望月[14]の解析プログラムに基づく. 細胞内の*Ca<sup>2+</sup>*, アデノシン 3 リン酸(ATP, Adenosine tri-phosphate), アデノシン 2 リン酸(ADP, Adenosine diphosphate), クレアチンリン酸(CP, Creatine Phosphate), クレアチン(Cr), 無機リン酸(Pi, inorganic Phosphte)の 6 種類の基質の反応拡散方程式を解くことによって電気生理現象を記 述している. 以下に反応拡散方程式を示す.

反応拡散方程式において、各基質の濃度変化は右辺第一項の拡散項と第二項の反応項*f<sub>i</sub>か*ら決定される.iは節点,Dは拡散係数を格納した対角マトリクス,[*A*]<sub>*i*</sub>は節点iにおける基質 Aの濃度である.基質ごとの拡散係数及び反応項の記述は望月[14]の定義に倣った.

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{Ca^{2+}} \nabla [Ca^{2+}]_i \right) + f_i^{Ca^{2+}}$$
(5.1)

$$\frac{\partial [ATP]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{ATP} \nabla [ATP]_i \right) + f_i^{ATP}$$
(5.2)

$$\frac{\partial [ADP]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{ATP} \nabla [ADP]_i \right) + f_i^{ADP}$$
(5.3)

$$\frac{\partial [CP]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{CP} \nabla [CP]_i \right) + f_i^{CP}$$
(5.4)

$$\frac{\partial [Cr]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{Cr} \nabla [Cr]_i \right) + f_i^{Cr}$$
(5.5)

$$\frac{\partial [Pi]_i}{\partial t} = \nabla \cdot \left( D_i^{Pi} \nabla [Pi]_i \right) + f_i^{Pi}$$
(5.6)

## 5.2.3 力学現象の記述

細胞内の筋原線維で生じる生理現象由来の収縮力分布を用いて、有限要素法によって力 学的平衡問題を解き、変形を解析する[14].筋肉は超弾性体と仮定した.超弾性体は歪みポ テンシャル関数 W を定義することのできる材料で、歪みから応力状態を一意に求めること ができるという特徴を持つ.

細胞の物性値には,望月[14]の用いた筋原線維の剛性を表す歪みポテンシャル係数と,細 胞質とミトコンドリアの剛性を表す歪みポテンシャル係数をそれぞれ 25 倍した値を用いて いる.細胞質とミトコンドリアの力学的データは存在せず,一般的な生体材料の特性を示す 3 次の Mooney-Rivlin 体の構成則を先行研究では用いており,適切な変形を示す値をパラメ ータとして選択する必要があるためかつ,計算が破綻しないような物性値を選択したため, このような物性値となった.

平衡方程式を以下の式に示す. V は解析領域, C は右 Cauchy-Green 変形テンソル, J は体積変化率,  $\lambda$ はラグランジュ未定乗数,  $\delta$ Eは u に由来する仮想歪み,  $f_b$ は応力境界条件, u は仮想変位,  $\kappa$  は体積弾性率,  $S_t$ は応力境界条件の定義される面である.

$$\int_{V} \left( 2 \frac{\delta W}{\delta \boldsymbol{C}} + \lambda J \boldsymbol{C}^{-1} \right) : \delta \boldsymbol{E} dV + \int_{S_{t}} \boldsymbol{\tilde{t}}_{b} \cdot \delta u dS = 0$$
(5.7)

$$\int_{V} \delta\lambda \left\{ (J-1) - \frac{2\lambda}{\kappa} \right\} dV = 0$$
(5.8)

## 5.2.4 解析条件

#### 境界条件

細胞膜を除くモデル表面では,流入0のノイマン境界条件を用いた.細胞膜においては, イオンチャンネルを介してイオンのみが出入り可能となっている.力学的な境界条件は,収 縮方向の片面を変位固定,もう1面を応力0とした.

#### 計算条件

電気生理解析には陽解法を用いた.タイムステップは最大1.0×10<sup>-3</sup> ms,最小1.0×10<sup>-7</sup> msとした.力学解析には陰解法を用いた.変形のタイムステップは1 ms とした.現 象時間が1000 ms 経過した時点で計算を終了する.計算時間は,Intel Xeon CPU E5-2640 v3 を4コア用いて計算して約96時間であった.

計算のアルゴリズムを以下に示す.



# 5.3 結果と考察

## 5.3.1 Ca<sup>2+</sup>拡散解析の評価

細胞内における $Ca^{2+}$ 濃度変化を図 5.8, 膜直下における $Ca^{2+}$ 濃度変化を図 5.9に示す. 膜直下の濃度は T 管節点における濃度の平均値としている. 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度は 43 ms で約 0.49  $\mu$ Mのピークを示しており、その後は徐々に減少、約 0.14  $\mu$ Mに収束した. 膜直下の  $Ca^{2+}$ 濃度は 10 ms でピーク値 3.91  $\mu$ Mを迎え、その後約 0.13  $\mu$ Mに収束した. また、200 ms において、細胞内及び膜直下における濃度減少の勾配が変化している. これらの濃度変 化は膜電位の変化に対応している.

望月[14]の解析結果では、細胞内濃度のピーク値は 81 ms で 1.1 μM, 膜直下濃度のピーク 値は 32 ms で 3.2 μMを迎えている.本研究のピーク値は、先行研究と比較して細胞内濃度 で約 45%、膜直下濃度で約 120%であった.この理由としては、*Ca*<sup>2+</sup>の放出器官である JSR の節点数が少ないことが考えられる.先行研究と本研究の JSR 節点の数を以下の表 6 に示 す.本研究のモデルにおける単位体積当たりの JSR 節点数が極めて少ないことがわかる. 膜電位が生じた後に少ない JSR 節点から集中的に*Ca*<sup>2+</sup>が放出された後に全体に拡散するが、 広く拡散することで全体の濃度は先行研究より小さくなったと考えられる.

本研究では、T管として定義された各節点の最近傍 NSR 節点を JSR 節点として定義して おり、T管の抽出の精度が JSR 節点数に直接影響を及ぼしているため、T管の精度を向上さ せることで JSR 節点数を増加させることができると考えられる.また、JSR 節点数が少ない 原因としては、1 つの T管節点に 1 つの JSR 節点を対応させるという手法が不十分であっ た可能性が考えられる.この場合、1 つの T管節点に対して複数の JSR 節点を定義させるこ とで広く JSR 節点を定義する必要がある.



図 5.9 膜直下におけるCa<sup>2+</sup>濃度変化

	モデル体積[µm <sup>3</sup> ]	JSR 節点数	単位体積当たりの JSR 節点数[/µm <sup>3</sup> ]	
先行研究[14]	464.31	803	1.73	
本研究	1272.60	486	0.38	

表 6 細胞モデル内の JSR 節点数の比較

次に, NSR における*Ca<sup>2+</sup>*濃度変化を図 5.10 に示す. JSR からの*Ca<sup>2+</sup>*放出に伴い濃度は減 少し, 40 ms で最小値 300 μMをとった. それ以降、*Ca<sup>2+</sup>*を汲み上げることによって濃度は 約 775 μMまで増加した.

望月[14]の解析結果では、48 ms で最小値 98 μMをとっており、本研究の最小値は望月ほ ど小さい値を示さなかった.これは、細胞質における*Ca*<sup>2+</sup>濃度の場合と同様、JSR 節点が少 ないことにより、*Ca*<sup>2+</sup>の放出量が少なくなっていることが原因と考えられる.

また,望月[14]の解析結果では,*Ca<sup>2+</sup>*濃度は約 500 μMで収束している.本研究の収束値 は望月の結果を約 55%上回った.これは NSR の*Ca<sup>2+</sup>*汲み上げ量が大きいことが要因であ ると考えられる.本研究では NSR の形状を筋原線維周囲のシェル要素として定義しており, 反応拡散解析においては筋原線維上のすべての接点が NSR としての役割を担っているが, 実際の NSR の形状は網目状である[15].筋原線維全体から汲み上げることにより,汲み上 げ量が増加していることが考えられる.反応拡散方程式を解く際に用いられるパラメータ の調節によって先行研究の値に合わせこむことで,差を小さくすることができると考えら れる.



図 5.10 NSR におけるCa<sup>2+</sup>濃度変化

次に,筋原線維の収縮方向を含む断面における $Ca^{2+}$ 拡散の様子を示す.図 5.11 及び図 5.12 に示す断面における $Ca^{2+}$ 濃度の分布を図 5.13 に示す. 膜電位発生後に $Ca^{2+}$ が JSR から放出されることで,JSR の集中する箇所から筋原線維内の $Ca^{2+}$ 濃度は上昇した. 200 ms を 過ぎると NSR による $Ca^{2+}$ 波み上げが細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化に大きく影響を及ぼすように なり,筋原線維内 $Ca^{2+}$ 濃度は低下した.

力学電気生理連成解析



図 5.11 断面位置



図 5.12 断面画像



## 5.3.2 力学的変形の評価

カ学解析の結果として,モデル内各節点に生じる収縮力の平均値の変化を図 5.14 に示す. 筋原線維中の*Ca<sup>2+</sup>*濃度の上昇に伴って収縮力は増加し,153 s で 3.16 kPa のピーク値を示した.細胞内の*Ca<sup>2+</sup>*濃度のピークが生じた 43 ms に対して,遅れて収縮力はピークを迎えた. それ以降,細胞内*Ca<sup>2+</sup>*濃度減少に伴い収縮力も減少している.

望月[14]の解析結果では、収縮力は210 ms にピーク値7.1 kPa を示している.本研究との 収縮力のピーク値の差は、*Ca*<sup>2+</sup>濃度の差に直接起因すると考えられる.濃度変化を踏まえ た力学的変形が生じていると結論付けられる.



図 5.15 には、図 5.11 に示す断面における筋原線維に生じた収縮力の分布を示す.図 5.13 に示された*Ca<sup>2+</sup>*濃度変化が生じる領域から収縮力が変化する様子が確認される.

一般的な変形量は10~20%程度であるのに対して,本研究の細胞モデル全体の変形は最大 0.2%であった. *Ca*<sup>2+</sup>濃度の不足に起因して収縮に十分な収縮力が出なかったことが原因と 考えられる.また,解析が回るよう設定した筋原線維,ミトコンドリア,細胞質の物性値が 大きかったことが考えられる.



図 5.15 筋原線維における収縮力の分布

6	結言		

# 6.1 結論

心筋細胞微細構造の SBEM 画像から,深層学習及び画像処理に基づく手法によって細胞 内小器官の形状を抽出することによって,実形状細胞モデルを作成した.その際,ミトコン ドリアを高い精度で抽出する条件を明確にし,他の細胞画像に適用する道筋を示した.

また,作成したモデルを使用して力学電気生理連成解析を行い,心筋細胞の収縮現象の再 現を行った. 膜電位の変動に伴って細胞内の基質の変化が確認され, *Ca<sup>2+</sup>*濃度の変動に伴 って収縮力が変動する様子も確認された. *Ca<sup>2+</sup>*濃度や収縮力のピーク値は先行研究の結果 と比べて半分程度の値となったが, JSR 節点数の増加により改善されると考えられ,深層学 習と画像処理によって作成された実形状モデルの解析への有用性が確認された.

# 6.2 今後の課題と展望

解析結果に大きく影響を及ぼしていたと考えられる T 管の抽出精度の向上が求められる. その際, T 管の形状を分析するという点では正確な形状の抽出手法の開発が求められるが, 解析を行うためのモデル作成という観点では,小器官の正確な形状は不必要であり,他の小 器官との相対的な配置がおおまかに判断できる程度で十分といえる.したがって,4章の手 法で抽出された T 管領域を線維方向に繋いだ簡易 T 管モデルを作成することも解析モデル 作成において有効であると考えられる.

解析結果の先行研究結果との一致が見られるようになった際には、他の細胞への適用が 見込まれる.特に3章で扱った MPL ノックアウトマウスの心筋細胞画像(細胞 C)に適用す ることで、小器官の形態と力学的及び生理的現象との連関について病理状態の細胞と正常 な細胞との間で比較を行うことができる.本研究の手法によって、他の様々な細胞画像から 解析で扱う細胞モデルを作成することで、統計的な分析をも可能とする.
#### 謝辞

本研究は多くの方々のご指導,ご協力の下で行われました.ここに感謝の意を述べさせていただきます.

波田野講師には終始手厚くご指導いただきました.大変ご多忙な中でもお時間を作って 下さり、どんな相談や質問にも快く応じていただきました.先生のご指導のおかげで3年 間研究を進めることができました.また、学部4年の当初は本研究のテーマに関する知見 は乏しかったですが、進めていくうちに本格的に興味を持って研究に臨めるようになった のは先生の熱意あってのことと思います.

泉教授には研究会などでは多くのご助言をいただき,研究が行き詰った際には進めてい く足がかりを与えてくださりました.また,発表練習における先生のご指導のおかげで発 表の手順やわかりやすい伝え方について勉強させていただきました.以前から抱いていた 発表への苦手意識が多少和らいだように思います.

榊間助教には研究会などで多くのご助言をいただいたほか,普段からよく気にかけてくださり,相談にも乗っていただきました.研究の話に留まらず様々なお話をさせていただき,3年間非常に居心地よく研究室生活を送れました.

星島様には本研究で使用した細胞画像を提供していただきました.新たな細胞のデータ を提供していただけたことで本研究での形状分析の幅が広がりました.

株式会社 JSOL の宮崎様には、メッシュ作成において多大なご協力を賜りました.

また,研究室では素敵な先輩方,同期,後輩に恵まれました.研究内容で多大なサポート を頂けたほか,日々の生活において楽しく3年間過ごすことができました.平能さんには研 究室の先輩として様々なことを教えていただきました.机が隣だったこともあり,日々の研 究室での生活すべてにおいてお世話になったかと思います.永長君や望月さんは研究内容 に関する質問を快く聞き入れてくれたほか,何気ない雑談にも気軽に応じてくれたと思い ます.

最後に、常に支えてくれた家族に感謝致します.

皆様方,本当にありがとうございました.

2022年2月7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] Tsushima K *et al.*, "Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lipotoxic Hearts Induce Post-Translational Modifications of AKAP121, DRP1, and OPA1 That Promote Mitochondrial Fission," *Circulation Research*, vol.122, 1, pp. 58-73, 2018.

[4] 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.

[5] S. Wei, A. Guo, B. Chen, W. Kutschke, Y.-P. Xie, K. Zimmerman, et al., "T-tubule re-modeling during transition from hypertrophy to heart failure," *Circ.*, 107, pp. 520–531, 2010.

[6] A. Guo, C. Zhang, S. Wei, B. Chen, L.-S. Song, "Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure," *Cardiovasc.*, 98, pp. 204–215, 2013.

[7] 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.

[8] M. Iqbal *et al.*, "Mitochondrial Organelle Movement Classification (Fission and Fusion) via Convolutional Neural Network Approach," *IEEE Access*, vol. 7, pp. 86570-86577, 2019.

[9] 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.
[10] 染谷誠,"電子顕微鏡画像に基づく心筋細胞微細構造モデルの作成手法の開発,"東京 大学,2020.

[11] M. A. Colman, C. Pinali, A. W. Trafford, H. Zhang, and A. Kitmitto, "A computational model of spatio-temporal cardiac intracellular calcium handling with realistic structure and spatial flux distribution from sarcoplasmic reticulum and t-tubule reconstructions," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 8, 2017.

[12] 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.

[13] 橋本瑞樹,"心筋細胞内微細構造の実形状を用いた電気生理現象の解明,"東京大学, 2019.

[14] 望月優,"心筋細胞の実形状データにおける微細構造のモデリング手法の開発," 東

京大学, 2021.

[15] 大塚長康他, "形態学の立場からみた心筋細胞," 心電図, vol.3, pp.595-599, 1983

[16] 林秀晴 他,"心筋のカルシウムスパーク," 循環器専門医, vol. 8, pp. 3-8, 2000.

[17] 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.

[18] 斎藤康毅, 2016, 『ゼロから作る Deep Learning : Python で学ぶディープラーニングの 理論と実装』, O'Reilly Japan.

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

[20] 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.

[21] 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.

[22] Wong, J., Baddeley, D., Bushong, E.A., Yu, Z., Ellisman, M.H., Hoshijima, M., Soeller, C.,
 "Nanoscale Distribution of Ryanodine Receptors and Caveolin-3 in Mouse Ventricular Myocytes:
 Dilation of T-Tubules near Junctions," *Biophys.*, 104, 11, pp. 22–24, 2013.

[23] Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P, "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure," *Cell.*, 88, 3, pp. 393-403, 1997.

[24] The ImageMagick Development Team, 2021. ImageMagick.

[25] Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., "Computer visualization of

threedimensional image data using IMOD," J. Struct. Biol., 116, 1, 71-76, 1996.

[25] Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K., "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat Methods*, 9, 671–675, 2012.

[26] Collins TJ, "ImageJ for microscopy," *BioTechniques*, 43, 25–30, 2007.

[27] 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," 東京大学, 2021.

[28] CV リファレンスマニュアル. http://opencv.jp/opencv-

1.0.0/document/opencvref cv morphology.html, (参照 2021-11-20)

## 修士論文

# 深層学習を用いた心筋細胞モデルの作成と 力学電気生理連成解析

## 2022年2月7日提出

## 指導教員 波田野 明日可 講師

37-206217 染谷 誠