

生体骨組織における骨髓腔画像のウェーブレット変換を用いた骨髓腔領域の認識手法

繁田 浩功¹ 間下 以大^{1,2} 金子 雄³ 菊田 順一³ 瀬尾 茂人¹ 竹村 治雄^{1,2} 松田 秀雄^{1,4}
石井 優³

概要: 生体イメージング技術の向上により生体内の細胞の動態を動画像として観察が可能となり, 疾病のメカニズム解明や創薬等への応用が期待されている. これらの応用のためには, 細胞画像から特定領域を抽出したり, 細胞の特定の動きを検出する必要がある. また, 膨大な数の画像に対して一定の基準で領域分割や細胞の検出を行うためには計算機での処理が必要である. 本稿では, その一例となる二光子励起顕微鏡を用いた骨髓腔画像の骨髓腔の領域分割手法を検討する. このような画像を解析するには, 時系列画像の時間情報を必要としない認識手法を確立することが好ましい. そのため, 本研究では骨髓腔画像に映り込む染まり方への模様に着目し, ウェーブレット変換を用いて特徴量の検出を行い, 骨髓腔の認識を行う方法を検討する. 本稿で提案した手法を用いることで, 対象画像においておおむね抽出に成功した例を確認した.

HIRONORI SHIGETA¹ TOMOHIRO MASHITA^{1,2} TAKESHI KANEKO³ JUNICHI KIKUTA³ SHIGETO SENO¹
HARUO TAKEMURA^{1,2} HIDEO MATSUDA^{1,4} MASARU ISHII³

1. はじめに

生体イメージング技術の向上により, 様々な生体内の細胞の動態の「生きたまま」「より局所的な」「より深い」観測が可能となり, 疾病のメカニズムの解明, 創薬等の重要な知見が得られることが期待されている. 最新の生体イメージング技術の一つに二光子励起顕微鏡があり, 骨組織内部の動画像の撮影が可能となった. 骨髓腔は硬い石灰質に囲まれた骨組織内部にあり, 生きたままでの観察が困難であったが, 二光子励起顕微鏡によって生体内の血管に血液が流れる様子や骨髓腔内の細胞の動態を映像として得られるようになった. 骨の破壊や再生に関わっているとされる破骨細胞や骨芽細胞の動態には未だ未知であることが多いが, この生体画像にはこれらの細胞の挙動に関して多くの知見が含まれていると考えられる. これらのメカニズムの

解明により, 骨粗しょう症等の疾病の原因の解明に繋がることも期待される. Kikuta らはこのイメージング技術を用いて, 破骨細胞が「骨の表面に存在するが骨の破壊をする破骨細胞 (R 型)」と「骨の表面に存在するが骨の破壊をしない破骨細胞 (N 型)」の発見に成功した [1]. このような生体画像からさらに多くの知見を得るためには, 手作業による画像の解析ではなく, 大量の動画像から特定の領域や細胞の動態を自動的に検出する手法が求められている.

二光子励起顕微鏡は, 対象となる細胞を直接撮影する方法ではなく, 投与された蛍光物質を撮影することで間接的に血管, 細胞や骨髓腔を観測する手法である. そのため, 分析上重要な組織は画像内で同一色で得られるため, 画像の認識には領域分割が必要となる. これらは人の目による輝度値や時間変化による画像の差分の確認, 染み出し時に現れる骨髓腔の模様等で組織の判断が行われる. 本稿では, 現れる模様等の情報を中心に画像特徴量を抽出し, 機械学習を用いて領域分割する手法を検討する.

2. 関連研究

バイオイメージング技術の発達により様々な分野で生体細胞画像を大量に得ることが可能となり, それに伴って細

¹ 大阪大学大学院情報科学研究科
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University
² 大阪大学サイバーメディアセンター
Cybermedia Center, Osaka University
³ 大阪大学大学院医学系研究科
Graduate School of Medicine, Osaka University
⁴ 大阪大学免疫学フロンティア研究センター
Immunology Frontier Research Center, Osaka University

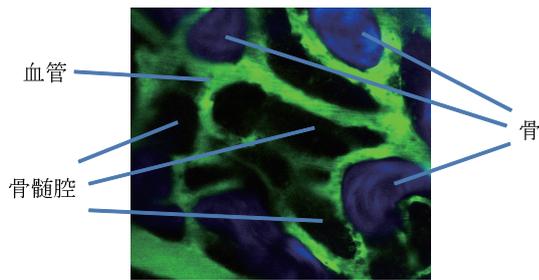


図 1 本研究の対象とする生体画像

胞画像処理に関する研究も進められている。近年の代表的な研究対象としてセルトラッキングが挙げられる。藤崎らは、ノイズが多くカラー情報がない細胞内動画の追跡を行った [2]。Meijering らは様々な手法の調査の後には様々な手法の調査の後、セルトラッキングに関して画一的な処理方法はないと結論付けている [3]。トラッキングは、単純な移動追跡のみならず、細胞融合や細胞分裂により複雑な変化が起こるために非常に困難である。このような細胞分裂などに対応可能な方法も、広く研究されている。一例として、Li らは細胞分裂を検出できる手法を提案している [4]。

二光子励起顕微鏡で得られた生体画像解析に関する研究として、Oliveieri らの研究が挙げられる [5]。リンパ球に関する生体イメージに対し、細胞のトラッキングを行う方法及びツールを提案している。

得られた画像に対する処理だけではなく、撮影される顕微鏡に焦点を当てた研究も存在する [6]。この研究では、顕微鏡から得られた画像について直接解析を行うのではなく、顕微鏡の特性のモデル化し、顕微鏡画像をさらに単純化している。これにより、位相差顕微鏡に関して、閾値だけでセグメンテーション可能な程度での画像の単純化に成功している。

以上に示すように、撮影対象画像の複雑性のみならず、その画像が得られる顕微鏡の特性といった多様な問題が存在するため、画一的な方法のみで解析を行うことは困難である。本研究の対象とする二光子励起顕微鏡を用いた骨組織に関する生体画像の解析手法に関し、我々の研究グループはこれまで画像セグメンテーション法の一つであるグラフカット法を用いた領域分割手法を提案してきた [7,8]。これらの方法はいずれも、撮影動画の時間方向の変化を考慮に入れたものであり、時系列データが存在する前提の手法であった。本研究では、任意のフレームの画像が与えられた場合に正しく認識するため、認識基準の一つとなる領域の模様の違いに着目して、画像の特徴量を用いて学習を行う手法を検討する。

3. 提案手法

本研究で対象とする生体画像の例を図 1 に示す。画像には主に骨、血管、骨髄腔の部位が含まれる。画像は二光

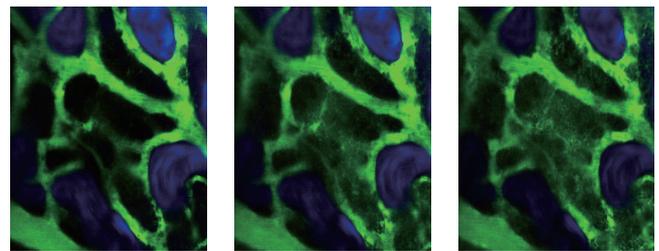


図 2 時間経過による生体画像の移り変わり
(左から右へ時間が経過)

子励起顕微鏡を用いて撮影されており、撮影時にマウスの頭部の骨組織の血管に蛍光物質 FITC (fluorescein isothiocyanate) を投与して撮影を行う。緑色で示されている蛍光物質は骨組織内部で血管上に多く流れるが、図 2 に示すように時間経過により骨髄腔領域にも徐々に染み出す。そのため、初期フレームにおいては血管領域の輝度値は高いが、時間の経過とともに血管領域と骨髄腔領域の輝度値は近づいていく。単純な輝度値のみを用いたセグメンテーション法では、時間が十分に経過した場合に骨髄腔領域と見分けがつかない問題が発生する。また、時系列画像が与えられた場合は時間変化の情報を用いることが可能となるが、時間に関係なく与えられた任意のフレームを認識できることが好ましい。

図 2 の左と右の画像を比較すると、骨髄腔である部分には輝度値の増加が見られるが、血液の染まり方は一様ではなく模様が現れており、血管上の模様とは異なることが見受けられる。この模様は蛍光画像の特徴として多くの画像で共通に見られる。そこで本研究では、骨髄腔に現れる模様を特徴量を用いて検出し、機械学習を用いて分類を行う方法を検討する。ただし、輝度の値等も特徴として利用可能であると思われるので、これらも総合した特徴量も検討する。模様の検出には様々なウェーブレットを用いて特徴量の抽出を行う。領域分割は血管と骨髄腔の間で行われるため、その結果を 2 クラス分類可能な機械学習の手法として SVM を用いて学習を行い、結果を議論する。

3.1 ウェーブレット変換

関数 $f(x)$ に対する二次元連続ウェーブレット変換は、

$$T_f(a, b, \theta) = \int_{\mathcal{R}^2} f(x) \frac{1}{a} \bar{\psi}\left(r_{-\theta}\left(\frac{x-b}{a}\right)\right) dx \quad (1)$$

ただし、

$$r_{\theta} = \begin{pmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) \end{pmatrix} \quad \theta \in [0, 2\pi) \quad (2)$$

と表される。ここで、 ψ はマザーウェーブレットであり、 a ($a \in \mathcal{R}^+$) はスケールパラメータ、 b ($b \in \mathcal{R}^2$) はシフトパラメータである。 $\bar{\psi}$ は ψ の共役であることを表す。ウェー

ブレット変換には離散ウェーブレット変換と連続ウェーブレット変換が存在するが、画像特徴量抽出に適した連続ウェーブレット変換を用いる。ただし、二次元画像データについて連続ウェーブレット変換を用いると計算量が大きくなりすぎることから、高速ウェーブレット変換が用いられる。スケールパラメータ a を固定することで、式 (1) のウェーブレット関数は入力信号とマザーウェーブレットの畳み込みの形となるため、畳み込み定理が利用可能となり、フーリエ変換を利用した高速演算が可能となる。スケールパラメータについて連続性が失われるが、複数のスケールパラメータを利用することで疑似的に複数のスケールについて検査することが可能である。

3.2 提案手法の概要

提案手法では、画像の全ての点を均等に扱うため、各画像の点ごとに特徴量を抽出し、特徴量ベクトルとする。特徴量としては、ウェーブレット変換以外に、輝度値、モーメント等も用いることで精度を高められると考えられる。以上のことから、ウェーブレットに加えてモーメントや輝度値を利用した特徴量についても検討を行う。

連続ウェーブレット変換に用いるスケールパラメータ a は、複数のパラメータの組み合わせを試し、それぞれの特徴量とする特徴ベクトルを用いる。輝度やモーメントを利用する場合は、このベクトルにそれぞれの情報を加える。

また、血流や模様の方角等に有益な特徴があることも考えられるが、本稿では方向性を考慮しない特徴量を用いることとした。そのため、ウェーブレット変換に与える角度 θ については、複数の角度を与え、全ての結果について足し合わせることにする。

また、データセットごとに単位距離ごとの画素数が異なるため、データセットごとに同一のスケールパラメータを用いるべきではない。そこで、ベースとなるスケール a と、データセット D における長さ $50\mu\text{m}$ の画素数を P_D とし、スケールパラメータは乗算を行った $a \cdot P_D$ を用いる。用いるマザーウェーブレット及びスケール、画素数等のパラメータは様々なものを試し、探索を行う。

以上、全てのデータセット、フレームごとにランダムな点を複数抽出し、それぞれの点の特徴ベクトルを求め、SVM を用いて識別を行う。

3.3 実装

対象としている生体画像は、二光子励起顕微鏡で生きたままの生体を観測しているため、脈拍等によって位置ずれが発生する。本研究では、事前に画像処理支援環境 ImageJ [9] のプラグインとして実装されている Turboreg [10] と Stackreg [11] を用いてあらかじめ画像の位置合わせを行う。Stackreg は Turboreg を間接的に利用し、その自動位置合わせアルゴリズムである Translation を用いて、目

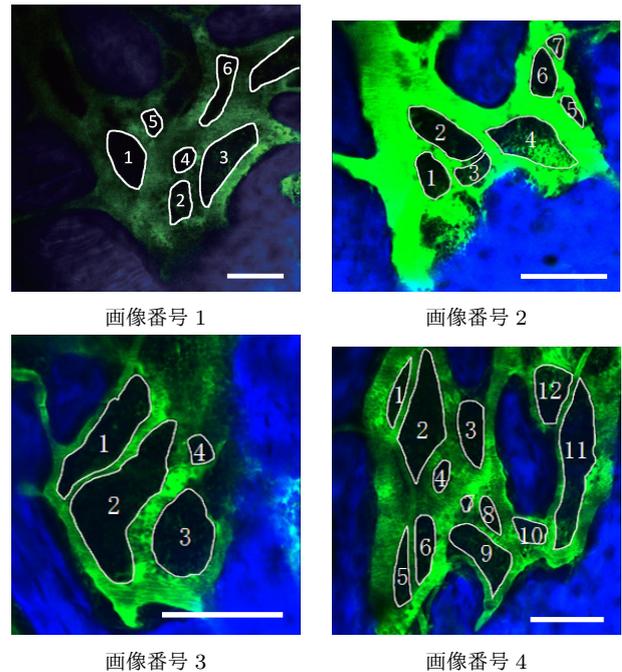


図 3 評価実験に用いた骨髄腔画像(スケールバー: いずれも $100\mu\text{m}$)

視で問題無く位置合わせが行われていることを確認した。また、撮影された蛍光物質は単一チャンネルに現れるため、蛍光物質が撮影されている緑チャンネルを取り出し、グレイスケールの画像として処理を行う。

具体的に、下記の手順に従う。

- データセットの区別なく、データ中の全ての画像それぞれについて下記の処理を行う
 - 画像に対して高速ウェーブレット変換を行う (この際、スケールパラメータはデータセットごとに算出される $a \cdot P_D$ を用いる)
 - 各画像ごとにランダムな点を複数選び出し、その点における特徴ベクトルを算出する
 - 全ての特徴ベクトルをデータを結合して訓練データを作成する
 - 交差検定のためにデータを分割する
 - SVM のカーネルスケールとコストパラメータを最適化するため、それぞれに 15 通りの初期値を生成する
 - パラメータの初期値それぞれについて交差検定を行い、交差検定損失関数を求める
 - パラメータ初期値から、交差検定損失関数が最小化となるパラメータを探索する
 - 15 通りのうち、最も損失の小さいものを SVM のパラメータとして選択し、最終的な識別器として出力する
- この手順において、ウェーブレットの種類及びスケールパラメータの組み合わせに関して探索を行う。また、輝度やモーメントをウェーブレットの特徴ベクトルに付け加える場合も考える。モーメント M を利用する場合は、ウェーブレットの特徴ベクトルに、 $M_{10}, M_{01}, M_{20}, M_{11}, M_{02}$ の 5 次元のベクトルを付け加えることとした。特徴量抽出のサンプルと

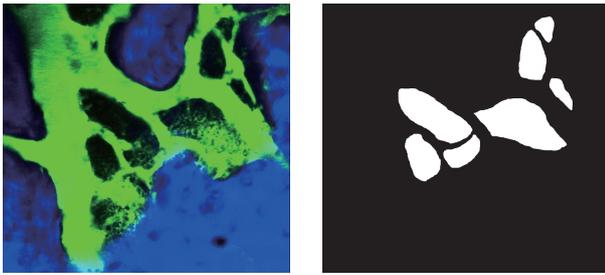


図 4 専門家により作成された真値の例 (画像番号 2)

表 1 評価実験に用いた骨髓腔画像の詳細

	画像解像度	フレーム数	骨髓腔の数
画像番号 1	752×752	7	6
画像番号 2	1,059×1,000	15	6
画像番号 3	958×1,000	22	4
画像番号 4	1,001×1,000	13	12

して選択された点 (p_x, p_y) に対して、 $p_x - 10 \leq x \leq p_x + 10$ 及び $p_y - 10 \leq y \leq p_y + 10$ の領域においてそれぞれのモーメントを算出する。用いる θ は $\pi/4$ ごとに 8 方向とし、前述の通りこれらを足し合わせる。SVM のカーネルは RBF カーネルとし、交差検定の分割数は計算量と精度の兼ね合いから 15 とした。また交差検定の損失関数は最小二乗誤差を用い、関数の最小化には Nelder-Mead のシンプレックスアルゴリズムを用いた [12]。

以上の実装には、MATLAB R2014a を用い、画像処理には Image Processing Toolbox, SVM には Statistics Toolbox, またウェーブレット変換には Wavelet Toolbox を用いた。

4. 評価

評価実験では、スケールとフレーム数がそれぞれ異なる時系列画像を 4 セット用いた。これらの画像のうち、それぞれ先頭のフレームと骨髓腔の位置を表したものを図 3 に、これらのデータの詳細を表 1 に示す。また評価対象として、これらの画像それぞれについて専門家が手動で領域分割を行ったデータを真値として用いる。画像 2 に対する真値の例を図 4 に示す。

これらについて本手法を適用して識別器を出力する。この識別器を用いて、改めてデータセットごとに予測を行い、データごとの出力を得る。本手法で得られた画像のうちの一例を図 5 (左) に示す。得られた識別器から、画像番号 2 に対して提案手法を適用した結果である。また、識別器を全てのフレームについて適用し、それらを重ね合わせたグレイスケール画像となっている。ウェーブレットに sinc ウェーブレットを用い、ベースとなるスケールパラメータには (3, 5, 8, 10, 15) を用いた場合の例である。特徴ベクトルとしては輝度値等を用いず、スケールパラメータのみからなる 5 次元の特徴ベクトルを用いた。なお、高速ウェー

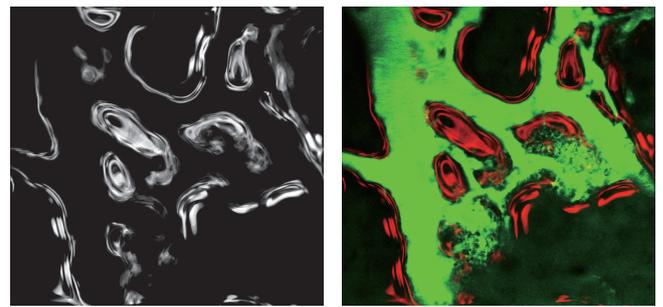


図 5 本手法の例 (画像番号 2)

(左) 本手法の認識結果 (右) 血液チャンネルを重ねたもの

レット変換に用いる sinc ウェーブレットのフーリエ変換 $\hat{\psi}$ は次式で表される。

$$\hat{\psi}(\omega_x, \omega_y) = [\text{sinc}(A_x(\omega_x - \omega_{0x}))\text{sinc}(A_y(\omega_y - \omega_{0y}))]^p \quad (3)$$

ここで、 (ω_x, ω_y) はスケールパラメータ a により決定される角周波数、 $A_x, A_y, \omega_{0x}, \omega_{0y} (\in \mathbb{R})$, また $p \in (0, \infty)$ は任意のパラメータである。ここでは、 $A_x = A_y = p = 1, \omega_{0x} = \omega_{0y} = 0$ の例である。

真値との比較を行うと、骨髓腔の領域をおおむね反映していることが読み取れる。特に、図 5 の青い領域で示される部分は、本手法適用時には除外されている骨領域であるため、輝度による判断が付きにくい部分である。しかしながら、おおむね骨の領域には反応せず、骨髓腔のみが検出される結果が得られた。一方で、骨髓腔と血管の境界付近に誤検出が多く見られる。図 5 (右) のように元画像の血管と重ね合わせたところ、骨領域のエッジ部分が認識されていることが分かった。以上ことから、画像処理のエッジ検出などの技術を組み合わせることで精度の向上することが考えられる。

次に、モーメントと gauss ウェーブレットを用いて学習し、画像番号 4 に適用した例を図 6 に示す。ベースとなるスケールパラメータには (1, 2, 4, 8, 16) を用いた。gauss ウェーブレットのフーリエ変換 $\hat{\psi}$ は次式で表される。

$$\hat{\psi}(\omega_x, \omega_y) = (i\omega_x)^p \exp\left(-\frac{(\sigma_x\omega_x)^2 + (\sigma_y\omega_y)^2}{2}\right) \quad (4)$$

ここで、 (ω_x, ω_y) はスケールパラメータ a により決定される角周波数、 $\sigma_x, \sigma_y (\in \mathbb{R})$, また $p \in (0, \infty)$ は任意のパラメータで、全て 1 を用いた。この例では主にエッジのみが検出されてしまい、骨髓腔の認識に失敗している例である。モーメントの情報を加えたことで、主にエッジの認識率が上昇したが、骨髓腔と骨領域はほとんど領域分割できない結果となった。以上のことから、骨髓腔を認識するための血液染み出しの模様を検出する手法は、ウェーブレットの選択及び特徴量の選択を工夫することで成功する可能性があるが、選択を注意深く行う必要があると言える。



図 6 本手法の例 (画像番号 4)
(左) 真値 (右) 本手法の認識結果

5. おわりに

本研究では、二光子励起顕微鏡を用いて得られた骨髓腔の生体画像を対象画像とし、時系列画像の時間関係の考慮が不要なウェーブレット変換をベースとした特徴抽出手法について検討した。また、特徴ベースの手法を用いた提案手法を用いることで、画像の特徴を抽出できている例を示した。今後の課題として、様々なウェーブレットによる比較評価、また定量的評価を行い、膨大なパラメータ間から対象画像に適した手法を探索する必要がある。また離散ウェーブレットを用いた特徴抽出との比較等も挙げられる。本研究の最終目標には骨髓腔の領域分割を目的としているため、本稿のウェーブレットによる位置抽出情報を用いて、輝度情報等を元に領域分割を行うグラフカットに組み入れる等の方法を用いることで、より精度を上げられるということが考えられる。

参考文献

- [1] Kikuta, J., Wada, Y., Kowada, T., Wang, Z., Sun-Wada, G., Nishiyama, I., Mizukami, S., Maiya, N., Yasuda, H., Kumanogoh, A., Kikuchi, K., Germain, R.N., and Ishii, M.: Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function, *The Journal of clinical investigation* vol. 123, no. 2, pp. 866–873, (2013).
- [2] 藤崎 顕彰, 青木 健太, フォン ヤオカイ, 内田 誠一, 荒関 雅彦, 齋藤 有紀, 鈴木 利治: 細胞内粒子群の検出および追跡, 画像の認識・理解シンポジウム MIRU2012, OS6-01, (2012).
- [3] Meijering, E., Dzyubachyk, O., Smal, I., and Van Cappellen, W. A.: Tracking in cell and developmental biology, *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 20, No. 8, pp. 894–902, (2009).
- [4] Liu, A-A, Li, K., and Kanade, T.: Mitosis sequence detection using hidden conditional random fields, *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, pp. 580–583, (2010).
- [5] Olivieri, D., Faro, J., Gomez-Conde, I., and Tadokoro, C. E.: Tracking T and B cells from two-photon microscopy imaging using constrained SMC clusters, *Journal of integrative bioinformatics*, Vol. 8, No. 3, 180, (2011).
- [6] Yin, Z., Li, K., Kanade, T., and Chen, M.: Understanding the optics to aid microscopy image seg-

mentation, *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, pp. 209–217, (2010).

- [7] 宇佐見 潤, 繁田 浩功, 間下 以大, 黒田 嘉宏, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 石井 優, 松田 秀雄, 竹村 治雄, ”グラフカットを用いた骨髓腔画像の領域分割”, *情報処理学会 研究報告 Vol. 2014-MPS-97, No. 17*, (2014).
- [8] 繁田 浩功, 間下 以大, 金子 雄, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 竹村 治雄, 松田 秀雄, 石井 優, ”グラフカットを用いた生体骨組織における血管透過性の評価手法”, *情報処理学会 研究報告 SIG-BIO*, (2013).
- [9] Collins, T. J.: *ImageJ for microscopy.*, *Biotechniques*, Vol. 43, No. 1 Suppl, pp. 25–30 (2007).
- [10] Biomedical Imaging Group: TurboReg, <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/turboreg/> 最終アクセス 2014 年 12 月 09 日.
- [11] Biomedical Imaging Group: StackReg, <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>, 最終アクセス 2014 年 12 月 09 日.
- [12] Lagarias, J.C., J. A. Reeds, M. H. Wright, and P. E. Wright, “Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions,” *SIAM Journal of Optimization*, Vol. 9 Number 1, pp. 112–147 (1998).