

# グラフカットを用いた骨髓腔画像の領域分割

宇佐見 潤<sup>1,a)</sup> 繁田 浩功<sup>1</sup> 間下 以大<sup>1,2,b)</sup> 黒田 嘉宏<sup>1,2</sup> 菊田 順一<sup>3</sup>  
瀬尾 茂人<sup>1</sup> 石井 優<sup>3</sup> 松田 秀雄<sup>1,4</sup> 竹村 治雄<sup>1,2</sup>

受付日 2014年5月28日, 再受付日 2014年7月22日,  
採録日 2014年9月5日

**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したりする必要がある. 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. 本論文では, 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提案する. 本研究で対象とする生体細胞画像は生体の一部を時系列画像として撮影したものであり, 骨髓腔領域と血流領域を分割するには, 輝度値の高低や血流の有無等の情報を総合して判断される. 提案手法ではこれらの情報をエネルギー関数に取り入れたうえでグラフカットによる最適化を行い, 領域分割を実現する. 提案手法と従来のグラフカットとの比較評価を行った結果, hard-constraints というユーザの入力に依存した制約を用いていない提案手法が hard-constraints を用いている従来手法と同等以上の性能が得られることを確認した.

**キーワード:** 生体イメージング, グラフカット, 血流認識, 混合ガウス分布, 細胞画像処理

## A Bone-marrow Space Segmentation Method Using Graph-cuts

JUN USAMI<sup>1,a)</sup> HIRONORI SHIGETA<sup>1</sup> TOMOHIRO MASHITA<sup>1,2,b)</sup>  
YOSHIHIRO KURODA<sup>1,2</sup> JUNICHI KIKUTA<sup>3</sup> SHIGETO SENO<sup>1</sup> MASARU ISHII<sup>3</sup>  
HIDEO MATSUDA<sup>1,4</sup> HARUO TAKEMURA<sup>1,2</sup>

Received: May 28, 2014, Revised: July 22, 2014,  
Accepted: September 5, 2014

**Abstract:** Emerging bio-imaging technologies are expected to contribute to the discovery of new drugs and the mechanisms by which diseases survive. In applications involving cell and bacterial imaging, extracting a particular region or detecting cell motion is essential. Moreover, automatic extraction and detection in image processing are also required because it is unrealistic to manually process a large number of images accurately, uniformly, and in a short period of time. To help automate this process, we introduce a bone-marrow space segmentation method for two-photon excitation microscopy images. Cellular dynamics specialists typically separate regions of bone-marrow and other spaces using several criteria such as blood flow characteristics and intensity. Taking these consideration, we designed data-term in graph-cuts method to process sequential images of the inside of a living mouse. Results of evaluations and comparison with normal graph-cuts show that our proposed method, which doesn't uses hard constraints, achieves better performance than normal hard-constraints based graph-cuts methods.

**Keywords:** bioimaging, graph-cuts, blood vessel recognition, Gaussian mixture model, bioimage processing

<sup>1</sup> 大阪大学大学院情報科学研究科  
Graduate School of Information Science and Technology,  
Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>2</sup> 大阪大学サイバーメディアセンター  
Cybermedia Center, Osaka University, Toyonaka, Osaka  
560-0043, Japan

<sup>3</sup> 大阪大学大学院医学系研究科

Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka  
565-0871, Japan

<sup>4</sup> 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,  
Suita, Osaka 565-0871, Japan

a) usami.jun@lab.ime.cmc.osaka-u.ac.jp

b) mashita@ime.cmc.osaka-u.ac.jp

## 1. はじめに

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映像として観察することが可能となり、疾病のメカニズムの解明、創薬等に重要な知見が得られると期待されている。なかでも二光子励起顕微鏡はさまざまな生体を「生きたまま」でより局所的で、より深い生体内の観測を可能にした。

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。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]。このように、骨髓腔に出入りする細胞を発見・追跡することで、破骨細胞の挙動を解明し、骨粗しょう症等の骨を破壊するメカニズムの解明につながると期待される。

このような細胞の挙動をさらに解明するために、大量の映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。特に、骨髓腔領域の検出は特定の細胞の検出に必要とされているが、骨髓腔の映像は複数の構造物が重なり合って写っているため、一見すると曖昧な領域が多く、専門家による判断が必要であった。この問題に対し、本論文では専門家の判断基準を取り入れたグラフカットによる骨髓腔領域の分割手法を提案する。

## 2. 関連研究

細胞画像における領域分割に関する研究として、Yinらは単純ベイズ分類器を用いたセグメンテーションを提案している [2]。Erikの報告 [3]によると、領域分割手法はさまざまな手法が試されているが、過去の領域分割手法に関しては閾値を用いたものが多く見られる。二光子励起顕微鏡で得られた生体画像解析の例として、Oliveieriらはリンパ球に関する生体画像に対し、細胞のトラッキングを行う方法およびツールを提案している [4]。Yinらの研究 [5]では、顕微鏡の特性をモデル化し、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。

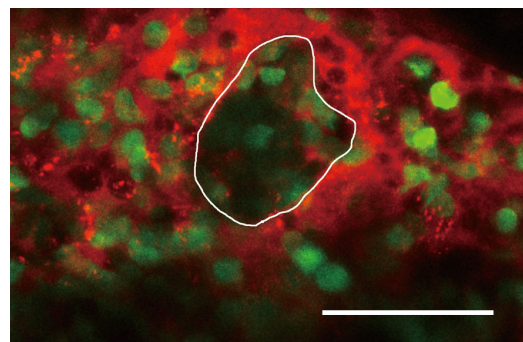
2つの領域の境界線を連続に追跡する動的輪郭モデルとしてSnakes [6]やLevel Set Method [7], [8]といわれる方法が提案されている。これらはノイズに対して頑強な境界の追跡法として広く用いられている。Level Set Methodを応用した例として、蛍光顕微鏡で撮影された細胞群を追跡するDzyubachykらの手法があげられる [9]。Level Setは適用可能範囲に制限があるため、蛍光顕微鏡画像でのセル

トラッキングの場合に対して最適化を行った方法を提案している。他の応用例として、形状を利用して心臓の左心室を認識し、Level Set Methodを拡張してトラッキングを行う方法も提案されている [10]。

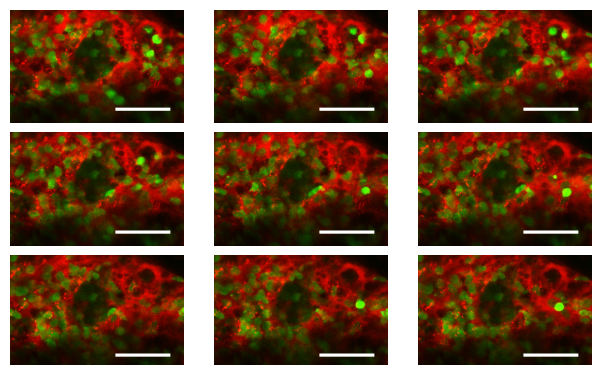
領域分割の代表的な手法として、グラフカット [11], [12]があげられる。グラフカットの生体画像に対する応用例として、血管透過性の評価のために、時空間ボリュームに対して適用した例 [13], [14]がある。グラフカットを医用画像に応用した研究として、Heldらがmacrophage spreadingの評価に用いた例があるほか [15]、Kleinerらは三次元偏光画像に対して二次Markov Random Fieldとグラフカットを用い、曖昧な神経線維のオリエンテーションの分類を行った [16]。また、形状に関する事前知識を利用する例として、成平らは肝臓領域のセグメンテーションに関して解剖学的形状特徴を取り入れ、事前入力 of 自動化等の工夫を通して自動化や認識精度の向上を実現している [17]。いずれの研究もそれぞれの画像の特徴に適した手法が提案されているが、本研究が目的とする画像に関する研究は行われていない。

## 3. グラフカットを用いた骨髓腔領域分割手法

本研究で扱う骨髓腔画像の例を図1に示す。二光子励起顕微鏡では図1(b)に示すような時系列画像として得られる。この画像では赤は血液であり、緑は細胞(好中球)で



(a) 骨髓腔領域 (スケールバー: 50 $\mu$ m)



(b) 時系列画像の一例 (スケールバー: 50 $\mu$ m)

図1 骨髓腔画像の一例 (画像番号1)

Fig. 1 Example of bone marrow images (Image No.1).

ある。また、図 1 (a) の白い線で囲まれた領域が骨髓腔である。骨髓腔領域とはこのような映像において、基本的には血液の存在しない領域である。対象画像は対象領域の位置や形状が変化しないことや、境界が曖昧な場合もあることから、グラフカットによる領域抽出手法が適していると考えられる。

対象とする細胞画像では、細胞や血管を流れる血液、時間の経過による血液の染み込みのような性質や、他にも、顕微鏡による見えにくい部分が発生する。そのため、Boykov らのグラフカットを用いたセグメンテーション [11] のように輝度値のみから決定されるデータ項では、正確なセグメンテーションは困難と考えられる。この問題を解決するため、本研究では専門家の判断基準をグラフカットのデータ項に取り入れる。

また、Boykov らの手法ではシードと呼ばれるユーザの入力を用いている。マウスクリックや矩形選択のような単純な方法で、画像の前景または背景の位置をユーザに指定させて利用する。領域分割において、このシードの位置情報が分割の結果に強く影響する。これは hard-constraints と呼ばれ、ユーザの認識を直接取り込んでいるため、良い性能を発揮することができる。しかし、画像単位でユーザに入力を求めるため、画一的な処理や大量の処理には適さない。本研究で対象とするような大量の画像に対する均一な処理が求められる場合には、すべての画像に対してユーザがそれぞれシードを与えることは現実的でない。本研究ではこれを改良し、一度のパラメータ設定で大量の画像に対する均一な処理を可能にする手法を提案する。

### 3.1 グラフカット

グラフカットは、さまざまな問題をエネルギーの最小化という枠組みでとらえる手法である [18]。画素等を表すサイトの集合に対して、それぞれのサイトにラベルを割り振る問題に置き換える。サイトへのラベルの配置に対してエネルギー関数を定義し、その最小化問題に置き換えて解を得る。

一般に、サイトの有限集合を  $V$  とする場合、ラベル  $L$  の配置  $X: V \rightarrow L$  に対するエネルギー関数  $E(X)$  は次の式で表される。

$$E(X) = \sum_{v \in V} g_v(X_v) + \sum_{(u,v) \in E} h_{uv}(X_u, X_v) \quad (1)$$

ここで、 $E \subset V \times V$  はサイト間の隣接を表し、 $(u, v) \in E$  において  $u, v$  は隣接している。このとき、配置  $X$  に対してサイトの因子のみで決まる  $g_v$  を含む第 1 項は一般にデータ項、またサイト間で  $X$  に与えられるラベルの関係により定義される  $h_{uv}$  を含む第 2 項は平滑化項と呼ばれる。サイトの集合やラベルの集合、さらにデータ項や平滑化項を表す関数  $g, h$  は問題に応じて柔軟に定義できるため、幅広い応用が可能である。具体的には、問題に対応す

るグラフを定義し、データ項や平滑化項に対応する辺の重みを持たせる。エネルギーの最小化はこのグラフの最小切断問題に置き換えることが可能であり、さらにその双対にあたる最大流問題を解くアルゴリズムを用いて最適解を得ることができる。

### 3.2 エネルギー関数

Boykov らの手法のデータ項は、ユーザの入力による hard-constraints と輝度値のみの発生確率に基づく式が用いられている。本研究が対象としている画像の性質上、この手法を単純に利用することで領域分割を行うことは困難であるため、グラフカットのデータ項を専門家の判断基準を参考にして設計することで骨髓腔領域の領域分割を実現する。

二光子励起顕微鏡の画像では前後に存在する血液等も重なって撮影されるため、図 1 にもあるように、骨髓腔内においても赤い領域が存在する。このような映像に対し、専門家は、

**判断基準 1** 血液の流れていない部分 (図 1 中央の暗い部分) でおおまかな骨髓腔の領域を判断する、

**判断基準 2** 血液の色 (図 1 の赤い領域) を利用して血管の領域を判断する、

**判断基準 3** 骨髓腔と血管の境界線が不明確な場合は、時系列画像内で血液の流れで骨髓腔と血管の境界を判断する、

等の判断基準によって骨髓腔領域を認識している。判断基準 1 と判断基準 2 については基本的には血液の輝度を用いて判断されているため、輝度値の利用が有効と考えられる。また、血液の輝度は一様でなく、染色されていない細胞等を含んでいるため、空間的に細かく変化している。輝度値だけではこのような変化の影響を受けるため、空間的な輝度の変化も考慮する必要がある。判断基準 3 の血流のある領域とは、図 1 の場合、赤い領域の濃淡が一定の方向に移動している領域である。血流の有無が判断に用いられているが、流れる方向は重要でないと考えられる。そのため、判断基準 3 に対しては時間的な輝度の変化を考慮することが有効だと考えられる。以上から、エネルギー関数には、Boykov らが用いている輝度値に加え、空間方向の輝度の変化、時間方向の輝度の変化をさらに考慮する。空間方向の輝度の変化は方向の影響を受けずに定量化できるラプラスアンフィルタを用い、時間方向の輝度の変化は画素ごとにフレーム間差分の総和を求めることで算出する。

また、同じ環境で撮影された異なる画像への領域分割に対応するため、画像単位のシードを作成する手間を軽減することを考慮する。本手法では、hard-constraints に対応する概念として尤度関数を導入し、ユーザが与えるシードを用いてその撮影環境における尤度関数のパラメータを推定する。これにより、同一条件で撮影された異なる画像に

関しても同一のパラメータを利用することが可能となり、画像単位でのユーザの入力は不要となる。

以上すべてを考慮してエネルギー関数のデータ項を決定する。Boykov らの手法と同様に、データ項は前景（骨髄腔領域）と背景（骨髄腔ではない領域）に対してそれぞれ定義する。前景に関しては、輝度、ラプラシアンフィルタ、フレーム間差分の値  $I_p$ ,  $F_p$ ,  $B_p$  を用いた前景の尤度関数をそれぞれ、 $P_{fR}(I_p|\theta_{fI})$ ,  $P_{fF}(F_p|\theta_{fF})$ ,  $P_{fB}(B_p|\theta_{fB})$  とする。 $\theta_{fI}$ ,  $\theta_{fF}$ ,  $\theta_{fB}$  は前景の各尤度関数のパラメータである。背景についても同様に  $\theta_{bI}$ ,  $\theta_{bF}$ ,  $\theta_{bB}$  に対する尤度関数を  $P_{bR}(I_p|\theta_{bI})$ ,  $P_{bF}(F_p|\theta_{bF})$ ,  $P_{bB}(B_p|\theta_{bB})$  とする。各尤度について重み係数  $\lambda_R$  と  $\lambda_F$ ,  $\lambda_B$  を用いて、前景のデータ項を

$$g_v^f(X_v) = \lambda_R \cdot P_{fR}(I(X_v)|\theta_{fI}) + \lambda_F \cdot P_{fF}(F(X_v)|\theta_{fF}) + \lambda_B \cdot P_{fB}(B(X_v)|\theta_{fB}) \quad (2)$$

と定義する。ここで、 $X_v$  は画像中の座標である。背景のデータ項も背景のパラメータを用いて同様に定義される。

各尤度関数に関しては、本手法では混合正規分布を用いた。正規分布は統計的に自然な分布を表現することが可能で、混合分布を利用することで多峰性を持つような複雑な分布にも対応でき、本手法の用途を含め幅広い分布の推定に対して適用可能である。尤度関数のパラメータの推定には、最尤法に基づいて推定する手法として一般的である EM アルゴリズムを利用する。

またエネルギー関数の平滑化項は、隣接関係の画素間で画素値が近いものが同じ配置に分類されやすくなる Boykov らの手法を用いて、

$$h_{uv}(l_u, l_v) = \begin{cases} 0 & (l_u = l_v) \\ c \cdot \exp\left(-\frac{(l_u - l_v)^2}{2\sigma^2}\right) & (l_u \neq l_v) \end{cases} \quad (3)$$

とする。ここで、隣接する画素  $u$ ,  $v$  に対する配置を  $l_u$ ,  $l_v$  とし、 $c$  はエネルギー関数に占める平滑化項の重みを表す任意の値である。また  $\sigma$  は隣接画素間の輝度差をどの程度許容するかを決定する値である。

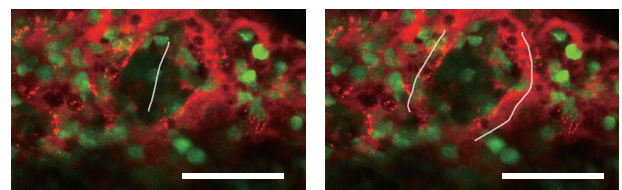
### 3.3 実装

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 [19] のプラグインとして実装されている Turboreg [20] と Stackreg [21] 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、目視で問題なく位置合わせが行われていることを確認した。また、Boykov らの手法は原則的に 1 チャンネル画像の領域分割を対象としている。本研究の対象画像は血液のチャンネル以外に細胞または骨領域のチャンネル

が含まれるが、本研究では血管チャンネルのみを利用するモデルであるため、すべての画像において血液のチャンネルのみを利用する。

Boykov らの手法は、まずユーザに対象画像を提示して前景および背景それぞれに複数のシード入力を行わせ、データ項を決定する。その後、エネルギー関数の重みや平滑化項の  $\sigma$  等の任意のパラメータを調整し、最大流量アルゴリズムを用いて最適解を得る。この解において各画素がどちらの端点に属するかによって前景と背景が決定される。一方、提案手法においては、事前準備としてユーザに対象画像を提示して前景および背景それぞれに複数のシード入力を行わせ、シードで指定された座標群の輝度、ラプラシアンフィルタ、フレーム間差分の前景と背景のそれぞれの頻度分布を求める。ユーザが前景および背景として与えるシードは、点入力よりも情報が多いマウスストロークによって与える方法とし、本手法でのシード入力としては、あらかじめユーザに対象画像を提示し、マウスでの 1~2 回程度のストロークの入力させたものを利用する。この分布から EM アルゴリズムを用いて前景、背景それぞれの  $\theta_{fI}$ ,  $\theta_{fF}$ ,  $\theta_{fB}$  および  $\theta_{bI}$ ,  $\theta_{bF}$ ,  $\theta_{bB}$  を推定する。同一条件の画像の領域分割を行う場合は、推定結果のパラメータに加え、調整のために必要なそれぞれのパラメータを与えてエネルギー関数を求め、Boykov らの手法と同様に最大流問題としての最適解を得る。 $\sigma$ ,  $\lambda$  等のパラメータは、Boykov らの手法と同様に、対象画像に応じてそれぞれ手動で調整する。パラメータは負でない実数で与え、特に上限を定めずに設定する。パラメータの調整は Boykov らの手法と同様に、極端な値を入力して結果を確認し、結果を確認しながら手動で再調整を繰り返して行う。

一例として、図 1 へのマウスストロークを図 2 に、また前景のストロークの輝度値の分布と、EM アルゴリズムを用いて推定を行った混合ガウス分布を図 3 に示す。横軸は輝度値であり、0 から 255 の範囲で表される。縦軸が頻出頻度（尤度）である。ここで推定した混合ガウス分布のパラメータは  $\theta_{fI}$  として領域分割に用いる。この例では混合数 2 でおおむね推定可能であり、他のデータに関しても同様であったため、すべての推定において混合数を 2 とした。また、 $F_p$  に用いられているラプラシアンフィルタは、そのカーネルサイズを  $5 \times 5$ 、標準偏差を 0.5 とした。



(a) 前景のシード (b) 背景のシード  
 図 2 図 1 へのマウスストローク入力 (スケールバー : 50  $\mu\text{m}$ )

Fig. 2 Mouse stroke input to Fig. 1.

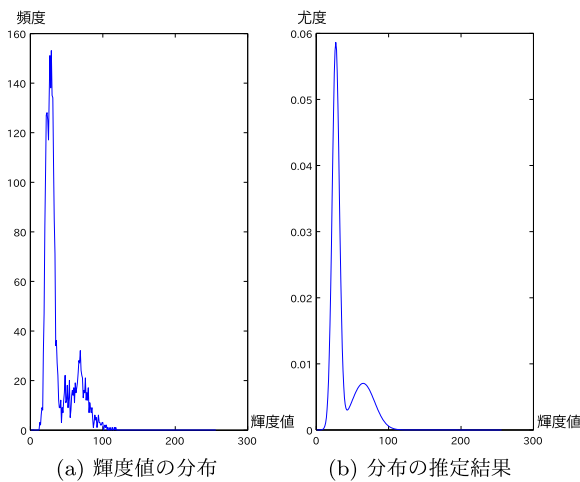


図 3 図 1 への前景ストロークの輝度の分布

Fig. 3 Intensity distribution of foreground mouse stroke to Fig. 1.

以上の実装には、MathWorks 社の MATLAB R2013b および Image Processing Toolbox, Statistics Toolbox を用いて行い、最大流量を求める処理には、Boykov らの C 言語の実装である maxflow 3.01 [22] を用いた。

#### 4. 評価実験

提案手法に対し、骨髓腔画像の領域分割の精度評価、グラフカットを用いた従来法との比較評価の 2 つの評価実験を行った。図 4 に対象画像の一例を示す。この図では緑が血液であり、青い領域は骨である。また、図中の白い線で囲まれた領域は専門家の手によって得られた骨髓腔領域である。この図のように、画像中には複数の骨髓腔領域が存在し、各領域には図中の番号のラベルが付けられている。本実験では、それぞれの骨髓腔領域に対してストロークによるシード入力を行い評価を行った。

##### 4.1 抽出精度

図 1 の画像に対して本手法を用いて骨髓腔の抽出を行った結果を図 5 に示す。それぞれのパラメータは図中に示すとおりである。図 1 の抽出結果の適合率と再現率を表 1 に示す。図 5(a), (b) の結果から、パラメータの中でも血流の重みを大きくすることで精度が得られることが分かる。この結果をもとにそれぞれのパラメータを変化させ、図 5(c) のように調整すると精度が得られる。すなわち、骨髓腔領域の抽出には時間的な変化が重要であり、提案手法は Boykov らの手法のデータ項にこれを加えたことで骨髓腔領域の抽出精度が向上しているといえる。パラメータの選定には本実験以外にもさまざまなデータでさまざまなパラメータを試しており、その中で最も良いと思われるパラメータを用いる。

##### 4.2 既存手法との比較

Boykov らの手法のデータ項は、画像単位で位置入力を

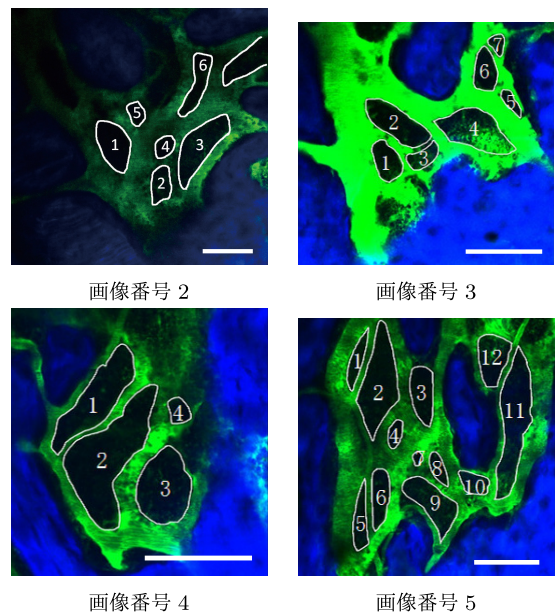


図 4 評価実験に用いた骨髓腔画像(スケールバー: いずれも 100  $\mu$ m)

Fig. 4 Bone marrow images for evaluation.

必要とする hard-constraints および輝度情報を用いている。本実験では提案手法に対して、Boykov らの hard-constraints と輝度を用いた場合 (比較手法 1) および hard-constraints を用いず、輝度情報のみを利用した場合 (比較手法 2) と比較する。すなわち、画像ごとにシードを与える必要があるが精度を高めることができる比較手法 1 と、画像ごとのシードは必要としない点では提案手法と同一であるがデータ項に工夫を行わない比較手法 2 との比較を行う。また、hard-constraints は画像ごとにユーザが直接真値の一部を入力する性質のものであるため、比較手法 1 は詳細な情報を与えれば与えるだけ真値に近づく。そのため、比較実験においては、提案手法とこれらの既存手法には同じマウスストロークによるシードの入力を用いることとし、シード入力に用いた画像での比較を行うこととした。すなわち、Boykov らの手法ではストロークをそのままシードとして用いる一方、提案手法ではストロークからデータ項のパラメータ推定を行い、その結果を利用して領域分割を行う。

##### 4.2.1 処理時間の比較

まず図 1 に関する処理時間について表 2 に示す。表中の  $\theta_R, \theta_F, \theta_B$  はそれぞれ  $\theta_{fR}$  と  $\theta_{fR}, \theta_{fF}$  と  $\theta_{bF}, \theta_{fB}$  と  $\theta_{bB}$  両方を示すものとする。CPU として Intel Core i7 4770K を内蔵し、Microsoft Windows 8 上で動作する端末を用いて測定を行い、10 回の処理の平均値を求めた。各パラメータの推定は特性により処理時間が大きく異なり、グラフカットに関しては他の手法と大きく変わらない結果となった。 $\lambda_B$  の推定に大きく時間がかかっているが、これはすべてのフレームの差分を求める処理の計算コストが高いためであると考えられる。推定処理全体で 22.11 秒であるが、同一条件の大量の測定データを一括解析する際には一度推定を行う

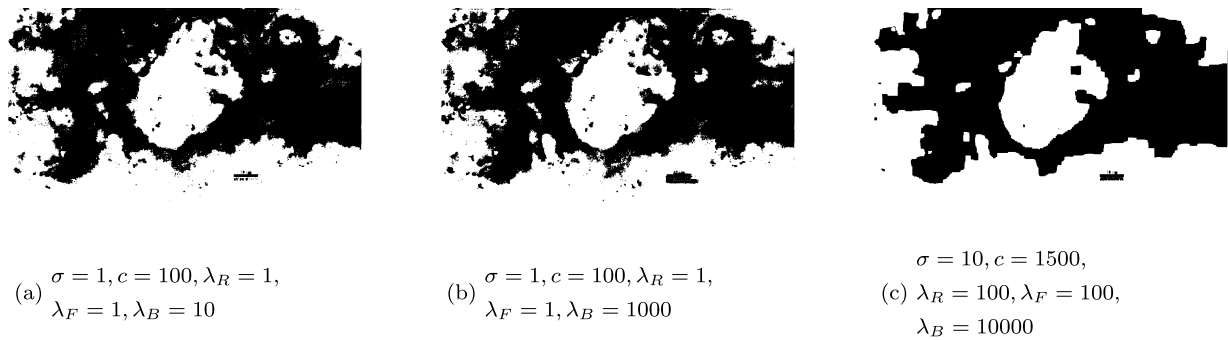


図 5 骨髓腔領域の抽出結果

Fig. 5 Extraction result of bone marrow regions.

表 1 図 5 の適合率と再現率

Table 1 Recall and precision of Fig. 5.

	再現率 [%]	適合率 [%]
図 5 (a)	83.7	96.2
図 5 (b)	81.9	96.9
図 5 (c)	85.6	97.2

表 2 図 1 に関する処理時間の平均 [s] (上段) と分散 (下段)

Table 2 Average and variance of processing time of Fig. 1.

	$\theta_R$ 推定	$\theta_F$ 推定	$\theta_B$ 推定	グラフカット
提案手法	6.66	1.82	13.63	3.12
	0.0569	0.0063	0.0627	0.0025
比較手法 1				2.81
				0.0002
比較手法 2				2.84
				0.0061

だけでよいので、実用上問題ないと考えられる。グラフカットの処理時間に関しては、提案手法は他の比較手法と比べ 10%程度遅い。これは、提案手法と比較手法で平滑化項とグラフ構造が Boykov らの比較手法と完全に同一であるため、データ項が複雑になった計算量の差であるといえる。いずれにせよ、最も計算コストの高いエネルギー関数の最適解を得る処理時間は変わらないため、データによらず Boykov の手法の場合に比べて大きな速度低下はないといえる。

#### 4.2.2 抽出精度の比較

図 1 の骨髓腔画像に対して骨髓腔を抽出した結果を図 6, 図 7 に示す。これらの結果から、Boykov らの手法では骨髓腔領域が他の領域とつながってしまい、抽出することはできなかったが、本研究の提案手法では抽出できていることが分かる。

提案手法と Boykov らの手法を比べると、Boykov らの手法では右上の領域の抽出に失敗している。また、左下では骨髓腔でない領域を誤検出しており、その結果他の領域とつながってしまっている。このことから、提案手法では既存手法の輝度値に血液の動きをデータ項に加えた結果、画素値だけでは認識が困難な部分の抽出が可能になったと考えられる。

図 1 と図 4 の合計 5 つの時系列骨髓腔画像に対して実験



$\sigma = 10, c = 100, \lambda_R = 10$

図 6 図 1 の画像に Boykov らのグラフカット (比較手法 1) を用いた結果

Fig. 6 Applied comparative method 1 to Fig. 1.



$\sigma = 10, c = 100, \lambda_R = 10$

図 7 図 1 の画像に Boykov らのグラフカット (比較手法 2) を用いた結果

Fig. 7 Applied comparative method 2 to Fig. 1.

を行った。骨髓腔の数は合計で 30 である。なお、本実験に関連するこれら骨髓腔ごとの詳細なデータは付録 A.1 に記載した。他の骨髓腔領域とつながらずに抽出できた場合に抽出に成功したとし、骨髓腔の抽出に成功した数を表 3 に示す。提案手法が 80.0%の骨髓腔領域の抽出に成功し、比較手法 1 では 70.0%, 比較手法 2 では 53.3%であった。提案手法でのみ分割に成功した骨髓腔における評価を表 4 に示す。これら結果から、提案手法は比較手法に対して安定して骨髓

表 3 骨髓腔領域の分割に成功した数

Table 3 Number of success to extract bone marrow regions.

	抽出率 [%]
提案手法	80.0
比較手法 1 (Boykov w/ HC)	70.0
比較手法 2 (Boykov w/o HC)	53.3

表 4 提案手法のみで分割に成功した骨髓腔領域の評価

Table 4 Evaluation of successful results produced by the proposed method only.

対象画像	再現率	適合率	$(\sigma, c, \lambda_R, \lambda_F, \lambda_B)$
1	85.6	97.1	(10, 1500, 100, 100, 10000)
3-1	96.6	96.6	(10, 100, 100, 100, 10)
3-3	96.5	73.3	(10, 100, 100, 100, 100)
3-5	80.4	98.6	(10, 50, 1000, 100, 100)
5-12	72.7	98.6	(10, 5, 100, 10, 50)
平均	85.8	91.2	-

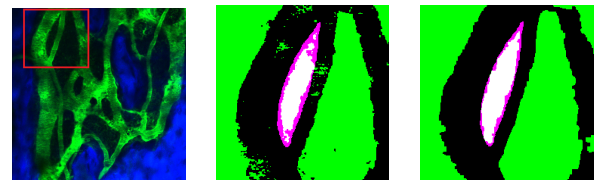
表 5 成功した領域分割の再現率の平均

Table 5 Average of recall in successfully segmented regions.

	比較手法 1	比較手法 2	提案手法
平均再現率	80.0	79.1	78.6
平均適合率	97.9	98.4	95.7

腔領域を抽出できているといえる。なお、骨髓腔領域における細胞動態の解析に対して実用上求められる抽出率の基準は、現段階では知られておらず、今後の分析内容にも依存する。骨髓腔の抽出率が高いほど撮影されたデータを有効利用できるため、分析を効率良く進めるためにもさらなる改善が求められる。表 4 の対象画像の列は (画像番号) - (骨髓腔領域のラベル番号) である。この結果から他手法では抽出できない場合でも抽出精度は低下しないことが分かった。

成功した領域分割の再現率と適合率の平均を表 5 に示す。これらの結果から成功した領域分割の再現率の平均は全体的に大きな差は見られなかった。提案手法の再現率が比較手法に比べて 17.5% 低かった画像番号 5-1 の例を図 8 に示す。図 8(a) は画像番号 5 の画像全体で、5-1 を含む拡大領域を赤い四角で示している。(b), (c) はそれぞれの手法の拡大領域における真値との比較結果である。その結果、従来手法に比べ、提案手法では血管領域を広めに (骨髓腔を小さめに) 抽出していたことが分かった。それ以外の例においても提案手法の再現率が小さかった場合は同様の傾向が見られた。これは、血流のパラメータを加えたために、境界付近の動きがある領域を血管領域と判断したためであると考えられる。比較手法は全体的に骨髓腔内部でも誤検知を多く含む傾向も見られたが、提案手法ではそれがなかったために、平均としては大差がない結果になっていると考えられる。また、適合率はすべての手法で高かったが、その中では提案手法が最も低かった。適合率が高かった理由としては、図 8 にも示されるように、比較手法も含



(a) 画像番号 5 と拡大領域 (b) 提案手法 (c) 比較手法 1, 2 (同一の結果) (色分けは TP 白, TN 黒, FP 緑, FN 赤)

図 8 画像番号 5-1 の真値と抽出結果の比較

Fig. 8 Comparison between ground truth and extraction result of Image No.5-1.

表 6 再現率 80% で抽出した骨髓腔領域の数

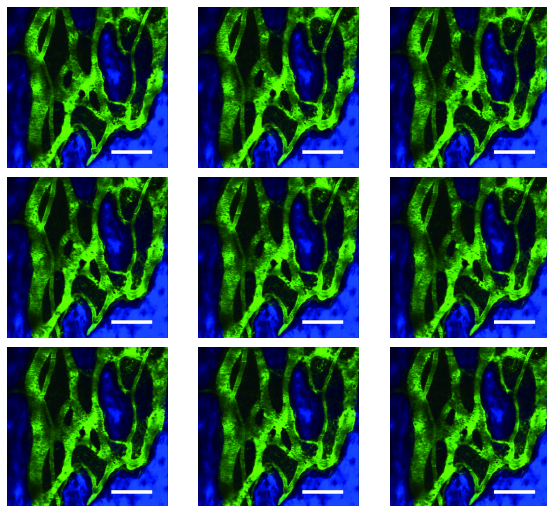
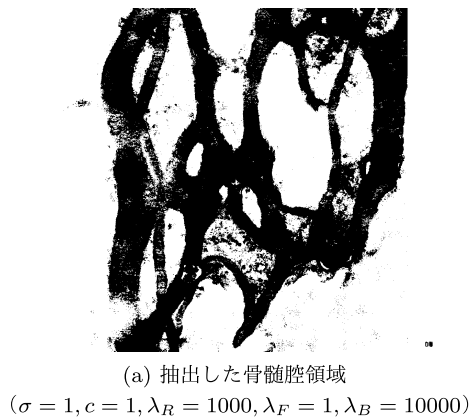
Table 6 Number of extracted bone marrow regions above 80% recall.

	比較手法 1	比較手法 2	提案手法
抽出数	13	8	14

めて全体的に骨髓腔の領域が小さく認識される傾向があるためであると考えられる。提案手法の適合率が低かった理由としては、比較手法では認識に失敗したが、提案手法でのみ成功した例の再現率に適合率が比較的低いものが存在しており、その値が全体の平均に影響を与えていることがあげられる。一方で、骨髓腔領域から何らかの医学的知見を得るためには骨髓腔の領域分割結果に対する分析が重要となるが、骨髓腔そのものの存在が認識できない場合は分析対象にすらならない。この事実を考えると、実用上は抽出率が重要であって、適合率や再現率の小さな低下は大きな問題とはならないといえる。

領域抽出の再現率が 80% を超えている対象画像の数について表 6 に示す。提案手法は再現率 80% 以上の領域分割に 14 例成功しており、比較手法 1 では 13 例、比較手法 2 では 8 例であった。分割に成功する割合は提案手法が高く、再現率 80% の領域分割は Boykov らの手法と大きな差は見られなかったが、hard-constraints を用いない比較手法 2 は大きく劣る結果となった。このことから、提案手法は画像単位での入力が必要な hard-constraints を用いていなくてもかわらず、用いている場合と同程度以上の性能を実現していることが分かる。

また、本手法で抽出に失敗した例に関して、比較手法 1 で成功しているが本手法で失敗している例については 3 例あり、比較手法 2 で成功しているが本手法で失敗している例は存在しなかった。前者の 3 例のうちの 1 つを図 9 に示す。図 9(a) が骨髓腔領域の抽出結果であり、(b) が対象の画像列である。図 9 の真値は図 4 の画像番号 5 のラベル付けされた領域であるが、図 9 の各所で抽出した骨髓腔領域が他の骨髓腔領域とつながっていることが分かる。また、画像列から、細い隙間を血液が流れており、比較的血流の時間的な動きが少ないことが分かる。他の 2 例についても同様であ



(b) 時系列画像の一例 (スケールバー : 100 $\mu$ m)

図 9 骨髓腔領域の抽出に失敗した例

Fig. 9 A case of failure to extract bone marrow regions.

り、輝度値での判断が困難で血液の動きがわずかである画像に対しては、提案手法では抽出に失敗することが分かった。

## 5. おわりに

本論文では、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として、血流領域と骨髓腔領域を分割する手法を提案した。輝度のみを用いた手法では分割できない問題に対し、対象とする生体画像の性質を考慮した定式化を行い、精度を向上させた。また、破骨細胞の挙動を解明するためには大量の生体画像の分析が必要となるが、従来法では、画像ごとにユーザのシード入力が必要であったため、自動解析は困難であった。提案手法では、同一条件の画像に対しては画像単位のユーザのシード入力を必要としないため、一括解析が可能となった。また、評価実験を行い、提案手法は一般的に用いられる Boykov らのグラフカットよりも安定して骨髓腔領域を抽出できることを確認した。一方、提案手法はデータ項に複数の画像処理の結果を用いているため、それぞれの重みを決めるパラメータの調整が必要である。今後の課題として、これらのパラメータを自動的に決定する手法の開発等があげられる。

## 参考文献

- [1] Kikuta, J., et al.: Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function, *The Journal of clinical investigation*, Vol.123, No.2, pp.866-873 (2013).
- [2] Yin, Z., Ryoma, B., Mei, C. and Kanade, T.: Cell Segmentation in Microscopy Imagery Using a Bag of Local Bayesian Classifiers, *The IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, pp.125-128 (2010).
- [3] Erik M.: Cell Segmentation: 50 Years Down the Road, *IEEE Signal Processing Magazine*, Vol.29, No.5, pp.140-145 (2012).
- [4] 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).
- [5] Yin, Z., Li, K., Kanade, T. and Chen, M.: Understanding the optics to aid microscopy image segmentation, *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, pp.209-217 (2010).
- [6] Kass, M., Witkin, A. and Terzopoulos, D.: Snakes, Active contour models, *International Journal of Computer Vision*, Vol.1, No.4, pp.321-331 (1988).
- [7] Osher, S. and Sethian, J.A.: Fronts propagating with curvature dependent speed: Algorithm based on Hamilton-Jacobi formation, *Journal of Computational Physics*, Vol.79, pp.12-49 (1988).
- [8] Sethian, J.A.: *Level Set Methods: Evolving Interfaces in Geometry, Fluid Mechanics, Computer Vision and Materials Sciences*, Cambridge University Press (1996).
- [9] Dzyubachyk, O., Van Cappellen, W.A., Essers, J., Niessen, W.J. and Meijering, E.: Advanced level-set-based cell tracking in time-lapse fluorescence microscopy, *IEEE Trans. medical imaging*, Vol.29, No.3, pp.852-867 (2010).
- [10] Paragios, N.: A level set approach for shape-driven segmentation and tracking of the left ventricle, *IEEE Trans. medical imaging*, Vol.22, No.6, pp.773-776 (2003).
- [11] Boykov, Y. and Jolly, M.P.: Interactive Graph Cuts for Optimal Boundary & Region Segmentation of Objects in N-D Images, *International Conference on Computer Vision*, Vol.I, pp.105-112 (2001).
- [12] Boykov, Y. and Funka-Lea, G.: Graph cuts and efficient n-d image segmentation, *International Journal of Computer Vision*, Vol.70, No.2, pp.109-131 (2006).
- [13] 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).
- [14] 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: 時空間ボリュームを用いた生体骨組織における血管透過性の評価手法, 画像の認識と理解シンポジウム MIRU2013, SS13-1 (2013).
- [15] Held, C., Wenzel, J., Wiesmann, V., Palmisano, R., Lang, L. and Wittenberg, T.: Enhancing automated micrograph-based evaluation of LPS-stimulated macrophage spreading, *Cytometry Part A*, Vol.83, No.4, pp.409-418 (2013).
- [16] Kleiner, M., Axer, M., Gräbel, D., Reckfort, J., Pietrzyk, U., Amunts, K. and Dickscheid, T.: Classification of ambiguous nerve fiber orientations in 3d polarized light imaging, *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, MICCAI 2012*, pp.206-213, Springer Berlin Heidelberg (2012).



[17] 成平拓也, 清水昭伸, 小畑秀文, 縄野 繁, 篠崎賢治: 単純と造影 CT 像からの転移性肝腫瘍セグメンテーション処理, 電子情報通信学会技術研究報告 MI 109 (127), pp.79-84 (2009).

[18] 倉爪 亮, 石川 博, 加藤丈和, 佐藤 淳, 三田雄志: CVIM チュートリアルシリーズコンピュータビジョン最先端ガイド 1, アドコムメディア株式会社 (2008).

[19] Collins, T.J.: ImageJ for microscopy, *Biotechniques*, Vol.43, No.1 Suppl, pp.25-30 (2007).

[20] Biomedical Imaging Group: TurboReg, available from <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/turboreg/> (accessed 2014-05-27).

[21] Biomedical Imaging Group: StackReg, available from <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/> (accessed 2014-05-27).

[22] Boykov, Y. and Kolmogorov, V.: maxflow, available from <http://pub.ist.ac.at/~vnk/software.html> (accessed 2014-05-27).

付 録

A.1 全実験結果

表 A-1 評価実験の全結果  
Table A-1 Result detail of experiment.

対象 画像	比較手法 1		比較手法 2		提案手法	
	再現率	適合率	再現率	適合率	再現率	適合率
1					85.55	97.15
2-1			72.56	99.92	82.77	83
2-2	72.82	93.61			77.54	95.36
2-3						
2-4	71.91	95.82	76.73	96.08	81.98	92.58
2-5	56.18	99.75	56.18	99.75	75.34	96.7
2-6	63.98	99.16				
3-1					96.64	96.57
3-2	70.44	100	71.55	99.49	74.89	99.88
3-3					96.49	73.31
3-4	88.88	91.7			95.54	89.87
3-5					80.39	98.6
3-6	93.53	98.72	92.97	99.05	85.59	95.22
3-7	86.88	98.92	86.88	98.92	84.48	98.44
4-1	87.43	99.73			80.32	99.96
4-2	88.3	98.98	88.49	98.97	84.57	99.89
4-3						
4-4	71.91	98.87	71.91	98.87	64.35	99.86
5-1	76.84	99.89	76.84	99.89	59.34	99.46
5-2	89.54	98.59	89.54	98.59	88.53	95.43
5-3						
5-4	80.99	99.93			63.74	99.94
5-5	82.04	97.02				
5-6	85.14	99.09	85.14	99.09	74.77	99.93
5-7	63.29	99.57	63.29	99.57	50.27	99.89
5-8	85.81	98.15	85.81	98.15	81.49	99.28
5-9	88.92	92.05	86.13	92.35	87.14	91.99
5-10	90.32	97.4	82.54	97.69	61.24	96.5
5-11	84.96	99.66				
5-12					72.73	98.57
平均	80.01	97.93	79.1	98.43	78.57	95.72

表 A-2 評価実験の全パラメータ

Table A-2 Parameter detail of experiment.

対象 画像	比較手法 1 ( $\sigma, c, \lambda$ )	比較手法 2 ( $\sigma, c, \lambda$ )	提案手法 ( $\sigma, c, \lambda_R, \lambda_F, \lambda_B$ )
1			(10, 1500, 100, 100, 10000)
2-1		(10, 100, 20)	(10, 30, 10, 10, 400)
2-2	(1, 100000, 20)		(10, 25, 200, 100, 500)
2-3			
2-4	(1, 100000, 20)	(10, 100, 10)	(10, 100, 500, 100, 300)
2-5	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 10, 100, 100, 200)
2-6	(10, 100, 10)		
3-1			(10, 100, 100, 100, 10)
3-2	(10, 100, 10)	(10, 70, 10)	(10, 100, 1000, 10, 1000)
3-3			(10, 100, 100, 100, 100)
3-4	(10, 100, 10)		(10, 10, 1500, 100, 100)
3-5			(10, 50, 1000, 100, 100)
3-6	(10, 100, 10)	(10, 100, 50)	(10, 5, 1000, 100, 200)
3-7	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 1, 5000, 150, 300)
4-1	(10, 100, 10)		(10, 1, 100, 10, 100)
4-2	(10, 100, 10)	(10, 150, 10)	(10, 1, 100, 10, 100)
4-3			
4-4	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 1, 100, 10, 100)
5-1	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 1, 200, 10, 200)
5-2	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 1, 100, 10, 100)
5-3			
5-4	(10, 100, 10)		(10, 1, 100, 10, 100)
5-5	(10, 100, 10)		
5-6	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 10, 100, 10, 100)
5-7	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 5, 100, 10, 100)
5-8	(10, 100, 10)	(10, 100, 10)	(10, 5, 100, 10, 100)
5-9	(10, 100, 10)	(10, 100, 100)	(10, 0, 1, 0, 0)
5-10	(10, 100, 10)	(10, 100, 100)	(10, 1, 50, 10, 300)
5-11	(10, 100, 10)		
5-12			(10, 5, 100, 10, 50)

表 A-1 に, 評価実験に用いたすべての対象画像について, それぞれの手法に対する再現率, 適合率を示す. 対象画像の列は (画像番号) - (骨髄腔領域のラベル番号) であり, 領域分割に失敗したものは空欄とする. また, それぞれの分割に用いたパラメータの一覧を表 A-2 に示す. ここでも, パラメータを調整したが領域分割に失敗した場合は空欄とする.



宇佐見 潤

トヨタ自動車(株)に勤務. 2012年大阪大学基礎工学部情報科学科卒業. 2014年大阪大学大学院情報科学研究科博士前期課程修了. 2014年より現職.



繁田 浩功 (正会員)

大阪大学大学院情報科学研究科博士後期課程在学中。2008年大阪大学基礎工学部情報科学科卒業。2010年大阪大学大学院情報科学研究科博士前期課程修了。バーチャルリアリティ学会会員。



間下 以大 (正会員)

大阪大学サイバーメディアセンター助教。2006年3月大阪大学大学院基礎工学研究科システム科学分野博士後期課程修了。博士(工学)。同年大阪大学サイバーメディアセンター特任研究員。2007年大阪大学産業科学研究所特任研究員。2008年4月より現職。2012年10月より2013年3月までオーストリア・グラーツ工科大学客員研究員。IEEE, 電子情報通信学会, ヒューマンインタフェース学会, バーチャルリアリティ学会各会員。



黒田 嘉宏 (正会員)

大阪大学サイバーメディアセンター准教授。2005年京都大学大学院情報学研究科博士後期課程修了。博士(情報学)。同年京都大学大学院医学研究科特任助手。2006年大阪大学大学院基礎工学研究科助教。2013年より現職。医用VR, 触覚情報処理, 教育訓練システムに関する研究に従事。IEEE, 日本バーチャルリアリティ学会, 生体医工学会, 日本VR医学会等に所属。



菊田 順一

大阪大学大学院医学系研究科助教。2006年大阪大学医学部医学科卒業。2013年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了。2013年より現職。



瀬尾 茂人 (正会員)

大阪大学大学院情報科学研究科助教。2006年大阪大学大学院情報科学研究科修了。博士(情報科学)。同年同研究科助手。2007年より現職。日本バイオインフォマティクス学会, MBSJ, IEEE 各会員。



石井 優

大阪大学大学院医学系研究科/生命機能研究科教授。1998年大阪大学医学部医学科卒業。2000年大阪大学大学院医学系研究科助手(2005年医学博士)。2006年米国国立衛生学研究所客員研究員。2009年大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任准教授。2011年同特任教授。2013年より現職。



松田 秀雄 (正会員)

大阪大学大学院情報科学研究科教授。1987年神戸大学大学院自然科学研究科修了(学術博士)。同年同大学工学部助手。1994年大阪大学基礎工学部助教。2002年より現職。バイオインフォマティクスの研究に従事。日本バイオインフォマティクス学会, ISCB, IEEE CS, ACM 各会員。



竹村 治雄 (正会員)

大阪大学サイバーメディアセンター教授。1984年大阪大学大学院基礎工学研究科博士前期課程物理系専攻修了。博士(工学)。1987年博士後期課程物理系専攻単位取得退学, 同年(株)ATR入社。1994年奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科助教授。2001年より現職。ヒューマンインタフェースに関する研究に従事。