

# Global Data Associationを用いた アメーバ状細胞の追跡手法

間下 以大<sup>1,a)</sup> 深野 淳<sup>1,b)</sup> 白崎 舞<sup>1</sup> 菊田 順一<sup>1</sup> 石井 優<sup>1</sup> 竹村 治雄<sup>1</sup>

概要：二光子励起顕微鏡の登場により、観察が困難とされてきた硬い石灰質に囲まれた骨組織内部を生きたままで観察することが可能となり、骨髓腔内で血液が流れる様子や骨髓腔における破骨細胞の動態を動画像として取得することが可能となった。しかし、細胞の観測に必要な細胞の動態の検出と追跡は現在専門家の手作業によって行われており、自動化が課題である。破骨細胞はアメーバ状細胞の一種であり、細胞核をもつ本体が仮足と呼ばれる細長い突出で繋がる構造をしている。動画像には実際には仮足で繋がっているはずの細胞同士が、ある時間では途切れている場合が多々存在する。それらは本当にちぎれている場合もあれば、撮影条件や細胞の活動状況等の理由で動画像に現れない場合もある。本研究では、このようなアメーバ状細胞の観測されない潜在的な細胞の一部も含めて検出し、追跡する手法を提案する。細胞追跡とラベル付けには、Global Data Association という手法を利用し、確からしいトラックレットの集合を1本のトラックに繋ぎ直して、追跡とラベル付けを行う。専門家の手による正解データと比較した結果、再現率88%、適合率83%で細胞を検出・追跡できた。グラフカットによる領域分割は、再現率59%、適合率96%であり、提案手法は再現率で大きく上回った。また、グラフカットでは検出できなかった潜在的な細胞の一部について検出できたと思われる領域分割も見られた。

## 1. はじめに

生体イメージング技術の発達の中で、二光子励起顕微鏡を用いた観測が登場した。この顕微鏡は、様々な生体を、生きたままで、より局所的に、より深い生体内の観測を可能にしている。生きたままでの観測によって、血流や代謝、細胞の動態などを観測することが出来るため、新たに大量の情報を得ることが可能となり、従来の観測技術では発見できなかった細胞のメカニズムの発見などに役立つことが期待されている [1]。

二光子励起顕微鏡によって新たに観測できるようになった領域の一つに骨組織の内部がある。骨は硬い石灰質であり、従来は内部の組織を骨から切り取って観測していたため、死んだ状態の細胞しか観測出来ず、生きたままでの細胞の動態を観測することは困難であった。この骨組織内部を生きたままで観測する技術と蛍光標識技術を用いて、石井らは破骨細胞は「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)」の二つの状態が存在することを発見した [2]。

二光子励起顕微鏡は、奥行き方向に一定の厚みを持った領域を2次元の画像として観測し、さらにそれを重ねることで3次元の領域を観測している。これを一定の間隔で撮影することで時間も含めた4次元のデータを計測している。さらに、動画像内には多数の破骨細胞が存在しており、このような膨大なデータ量の動画像から細胞の挙動の中で特定の挙動を見つけることは人の目では困難である。そこで、破骨細胞の動態を機械的に解析する必要があるが、そのためには動画像上で細胞がどのように動いているのかを追跡する必要がある。しかし、顕微鏡から得られる細胞動画像は、撮影条件や細胞の活動状況等の理由からその場所にあるべき細胞が常に見えているわけではないことが確認されている。そのため、細胞の追跡を行うにはそのような動画像上に見えていない潜在的な細胞の存在を検出した上で追跡する必要がある。そこで、本研究では、二光子励起顕微鏡によって観測された生体骨組織における破骨細胞の動画像を対象として、潜在的な破骨細胞の検出と破骨細胞の追跡手法を提案する。

## 2. 関連研究

細胞の追跡は、主に細胞の位置の変化を検出することで、

<sup>1</sup> 大阪大学  
Osaka University  
<sup>f1</sup> 現在、情報処理大学  
Presently with Johoshori University  
<sup>a)</sup> mashita@ime.cmc.osaka-u.ac.jp  
<sup>b)</sup> fukano.jun@lab.ime.cmc.osaka-u.ac.jp

セルトラッキングとも呼ばれる．Cell Tracking Challenge と表して ISBI2015 では 3 次元空間のセルトラッキングを行うコンテストが行われているなど活発に研究が行われている分野である [3]．

しかし，セルトラッキングは，単純な移動軌跡に加えて細胞融合や細胞分裂など複雑な変化を伴うものが多く，それぞれの研究対象や環境に依存した手法にならざるを得ない傾向がある．例えば，Liu らは，確率モデルを用いた細胞分化の発見方法を提案しているが，この研究の対象についての提案である [4]．細胞の追跡では，画像や対象ごとに別の手法が提案されている．

それらの別の手法の中にも大きく分けて 2 つあり，セグメンテーションによるものとモデルベースのトラッキングによるものがある．セグメンテーションによる追跡は，各時間で行った細胞検出の差から追跡を行うものである．モデルベースの研究の一つとして，備瀬らによる Global Data Association (GDA) がある [5]．GDA は，細胞の移動について可能性のある仮説を幾つか定義し，各仮説の尤度を求めることで，追跡を行う手法である．

### 3. Global Data Association を用いたアメーバ状細胞追跡

#### 3.1 対象画像と対象細胞の性質

本研究で扱う破骨細胞は，単球系血液細胞から分化・成熟する多核巨細胞で，骨吸収を担っている．破骨細胞は，骨の表面に広がる過程で他の破骨細胞とつながる性質を持っており，この多くの場合，紐状の細胞を経由して徐々に繋がり始め，次第に一つの大きな細胞になるということが観察されている．破骨細胞の活動の様子は，マウスの頭頂部の骨組織内部を二光子励起顕微鏡で撮影して得られる．撮影は骨の断面ではなく空間に対して行われ，奥行きによって濃淡が発生する．その例を図 1 に示す．図はある時刻における画像の一つであり，3 次元の画像データとして取得されたものを Maximum Intensity Projection によって 2 次元で表示したものである．このような細胞画像は撮影時に蛍光タンパク質を用いて活動している細胞を撮影している．この図では，破骨細胞が骨を壊すときに用いる「プロトンポンプ (= 強い酸を細胞外へ放出する装置)」に緑色蛍光タンパク質で標識を施すことでそれらの活動を観測している．画像上における緑色が細胞内のプロトンポンプ，黒色部分は主に骨である．石井らは，このような画像の観測から破骨細胞は骨吸収期の R 型と休止期の N 型の 2 つの状態を持つことを発見した [6]．すなわち，プロトンポンプの活動が低い場合や，はプロトンポンプの偏在によって，細胞内でも撮影されない領域が発生する．そして，そこに破骨細胞自体が存在するかを単一フレームの画像から読み取ることは難しく，前後の時間と見比べて推測する必要がある．

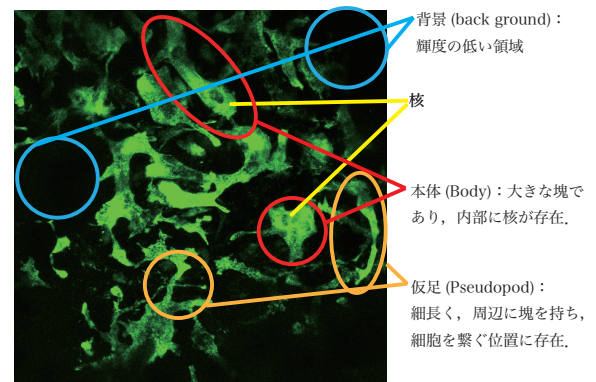


図 1 本研究で対象とするアメーバ状細胞画像．緑：プロトンポンプ，黒：その他(主に骨)

#### 3.2 アメーバ状細胞の検出と追跡に対するアプローチ

本研究では，図 1 に示すように，アメーバ状細胞画像の領域を核を持つ細胞の「本体」，本体間を繋ぐ「仮足」，細胞以外の「背景」の 3 つのモデルに分類し，検出を行う．さらに，これにより検出されない細胞の位置を推定するため，3 つのモデルの関係などから各画素ごとに「本体」や「仮足」，「背景」である尤度を設定する．また，あまり動かず追跡の容易な「本体」について GDA による追跡を行い，その後「仮足」による本体同士のつながりを考慮した最適化を行うことで，動画全体で矛盾のない追跡を行う．

#### 3.3 各領域の尤度

各領域の尤度 ( 本体:  $\rho_{Body}(x, y)$  , 仮足:  $\rho_L(x, y)$  , 背景:  $\rho_{BackGround}(x, y)$  ) を以下の式で定義する． $k$  は，座標  $(x, y)$  から最も近い各オブジェクトである．

$$P_{Body}(k) = \frac{1}{(1 + \exp(-2 \times (\frac{BodySize_k - T_{body}}{25})))} \quad (1)$$

$$\rho_{Body}(x, y) = P_{Body}(k) \times \frac{1}{d_b(x, y)} \quad (2)$$

ここで， $T_{body}$  は本体サイズの閾値であり， $d_b(x, y)$  は座標  $(x, y)$  と本体の距離である．

$$\rho_L(x, y) = P_{Arm}(k) \times l(x, y) \times \frac{1}{d_l(x, y)} \quad (3)$$

ここで， $P_L(k)$  はテンプレートマッチングによる検出結果であり， $l(x, y)$  は仮足の周囲の点  $(x, y)$  の仮足  $k$  の長軸方向への写像と短軸方向への写像の差， $d_l(x, y)$  は仮足  $k$  の中心からの距離である．

$$\rho_{BackGround}(x, y) = P_{BackGround}(x, y) \times P_n(x, y) \quad (4)$$

ここで， $P_{BackGround}(x, y)$  は， $(x, y)$  周辺の画素の緑色成分の割合であり， $P_n(x, y)$  は座標  $(x, y)$  仮足でも本体でもない確率である．

##### 3.3.1 Global Data Association

本研究では，アメーバ状細胞の活動を，移動，結合，消失，出現，分裂，の 5 つに定義し，画像上における動態と

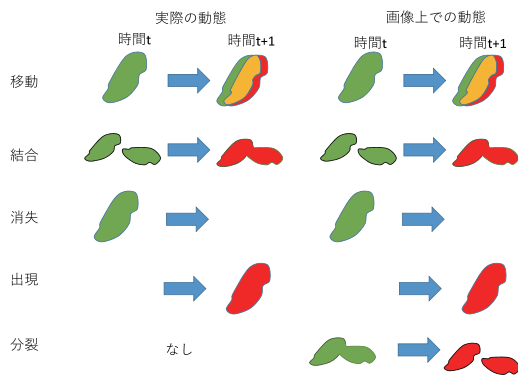


図 2 アメーバ状細胞の動態のパターン

実際の動態について、図 2 に示す．実際の細胞の動態では、消失や出現は観察されるフレームイン、フレームアウト、細胞死によって発生するが、画像上では一時的に輝度が下がり、観測出来なかった場合などでも消失や出現が観察される．また、アメーバ状細胞の本体は分裂は行わないが、画像上では分裂しているように観察される場合がある．これも、画像に写らない領域が原因で分裂して見えている．

上記のような、みかけ上の観測と実際に起こりうる細胞の変化の組み合わせについて、GDA では細胞の移動について可能性のある仮説を幾つか定義し、組み合わせと各仮説の尤度の中から、最適解を求める．細胞の位置を尤度で表現する本研究にこの手法を当てはめることで、細胞の位置の尤度が最終的に細胞の移動の尤度へと反映され、GDA によって最適解を求められる．

### 3.3.2 GDA を用いたアメーバ状細胞の追跡

GDA では、追跡を行うにあたってまず、トラックレットを作成する．このトラックレットは、前後の時系列での細胞の重なりなどを考慮し、これは同一の細胞であると確定できるようなものについてのみを追跡したものである．そして、これらのトラックレットを仮説によって繋ぎ、トラック全体を最適化することで追跡を行う．

本研究で取り扱うアメーバ状細胞の実際の動きは大きく分けて、移動、結合、消失、出現の 4 つであり、これに見かけ上観測される、分裂を加え、下記の仮説を用いる．

1. 始点仮説 (Initialization hypothesis) そのトラックレットの前につながるトラックレットがない状態をこの仮説によって表す．
2. 終点仮説 (Termination hypothesis) そのトラックレットの後につながるトラックレットがない状態をこの仮説によって表す．
3. 連結仮説 (Translation hypothesis) そのトラックレットの後につながるトラックレットが 1 つある状態をこの仮説によって表す．
4. 分岐仮説 (Dividing hypothesis) そのトラックレットの後につながるトラックレットが 2 つある状態をこの仮説によって表す．

5. 誤検出仮説 (False positive hypothesis) そのトラックレットが誤検出である状態をこの仮説によって表す．これらの仮説の尤度を以下の式で設定する．1. 始点仮説 (Initialization hypothesis)

$$\rho = \log P_{ini}(E_k) + 0.5P_{TP}(E_k) \quad (5)$$

$$P_{ini}(E_k) = P_{ini}(X_{k_0}^0) \quad (6)$$

2. 終点仮説 (Termination hypothesis)

$$\rho = \log P_{term}(E_k) + 0.5P_{TP}(E_k) \quad (7)$$

$$P_{term}(E_k) = P_{term}(X_k^{end}) \quad (8)$$

3. 連結仮説 (Translation hypothesis)

$$\rho = \log P_{link}(E_{k2}|E_{k1}) + 0.5P_{TP}(E_{k1}) + 0.5P_{TP}(E_{k2}) \quad (9)$$

$$P_{link}(E_{k2}|E_{k1}) = P_{link}(X_{k2}^0|X_{k1}^{end}) \quad (10)$$

4. 分岐仮説 (Dividing hypothesis)

$$\rho = \log P_{div}(E_{k2}, E_{k3}|E_{k1}) + 0.5P_{TP}(E_{k1}) + 0.5P_{TP}(E_{k2}) + 0.5P_{TP}(E_{k3}) \quad (11)$$

$$P_{div}(E_{k2}, E_{k3}|E_{k1}) = P_{div}(X_{k2}^0, X_{k3}^0|X_{k1}^{end}) \quad (12)$$

5. 誤検出仮説 (False Positive hypothesis)

$$\rho = \log P_{FP}(E_k) \quad (13)$$

$$P_{FP}(E_k) = 1 - P_{TP}\left(\sum_{i=1}^{end} (X_k^i)\right) \quad (14)$$

ここで、 $E_k$  はトラックレット  $k$  を表し、 $X_k^i$  はトラックレット  $k$  の  $i$  番目の要素を表す．

トラックレットはある領域について 1 つ前の時間の画像と比較し、十分に重なっている場合にトラックレットとして用いる．本研究では、細胞本体の位置を尤度によって確率的に定義しているが、ここでのトラックレットの作成は明らかにつながっているものだけでよいので、ここでは尤度を用いず、画像から読み取れた細胞本体のみについて重なりを考える．作成されたトラックレットを仮説によって結合すると、始点仮説の尤度の高いトラックレットが葉となり、連結仮説の尤度が高いものを辿り、終点仮説の高いトラックレットが根となるような木になる．

トラックレットをつなげた木構造の中で、分岐仮説が連結仮説よりも高い尤度を持っている場合というのは、画像上での細胞の動態に基づいたものであり、実際の動態においては細胞が分裂することはない．そのような場合、トラックレットをその通りに枝分かれさせるのではなく、その分岐したトラックレットを 1 つに結合しそれに連結するか、分岐前のトラックレットを二つに分割するのが実際の細胞の動きに準じた最適なつなぎ方である．また、GDA を用いた追跡では、本体のみの追跡を行っているため、仮



図 3 仮足のモデル化に用いるテンプレート

足による繋がりを考慮していない．そこで，モデル化の際につながっていると判定された細胞本体同士が別のトラックレットに存在していた場合，それをつなぎ合わせることで，仮足による本体同士の繋がりを考慮したトラッキングとなる．

## 4. 実装

### 4.1 細胞の検出

細胞の検出・追跡ともに，実装には，MathWorks 社の MATLAB 2016a 及び Image Processing Toolbox を用いて行った．各領域の尤度を求めるため，緑色成分に対して二値化を行い，画像上にある細胞の位置を取得することとした．

二値化された画像上には，細胞本体や仮足，ノイズなど様々なオブジェクトが存在している．これらのオブジェクトについて，「本体」であるか，「仮足」であるかを判定し，残りの部分を「背景」とすることで分割をする．ある領域が「本体」であるためには，閾値以上の大きさを持っているとし，「仮足」であるためには，図 3 のような簡易なテンプレートを用意し，回転を考慮してテンプレートマッチングすることで判定をした．

尤度計算のパラメータのうち，本体とする細胞の大きさの閾値を 350 画素，仮足となる距離の制限としてテンプレートにマッチした仮足の倍の長さまでとした．また，背景の確率を決める範囲を座標  $(x, y)$  を中心とする  $5 \times 5$  pixel とした．

### 4.2 細胞の追跡

1 つ前の時間の画像と比較し，同じトラックレットとなる候補の細胞同士がどの程度重なり合っているかによって判断する．時間  $t$  のある本体  $B_t$  が一つ前の時間  $t-1$  のある本体  $B_{t-1}$  と比較したときに， $B_t$  と  $B_{t-1}$  の関係を表 1 にまとめる．このとき， $B_t$  が  $B_{t-1}$  とつながっていた場合， $B_t$  は  $B_{t-1}$  と同じトラックに所属する． $B_t$  が  $B_{t-1}$  と分裂もしくは結合の関係にある場合，トラックを新たに作成し， $B_t$  はその新たなトラックの始点となる．そして， $B_t$  が  $t-1$  の時間に存在する本体の中から連続する本体を見つけれなかった場合も， $B_t$  は新たなトラックの始点となる．

本研究の対象画像では細胞本体はあまり動かないため，始点仮説の尤度は，時系列で最初の画像内の細胞を持つト

ラックにのみ設定し，ほかの場合は 0 とする．同じく，終点仮説の尤度は，時系列で最後の画像内の細胞を持つトラックにのみ設定し，ほかの場合は 0 とする．連結と分岐の確率は，細胞が重なり合っている割合をその確率とし，尤度を求める．また，各トラックが TruePositive である確率は，トラック内で細胞が重なり合っている割合をその確率とする．

アメーバ状細胞は画像上では分割されることがあるため，木の構成段階では分割を含んだ式で木を表した．しかし，実際にはそのような細胞の動きは発生しないため，そのような動きが発見された場合，それを実際の動きに当てはめて置き換える必要がある．結合は起こるが分岐は起こらない場合，可能性がある実際の細胞の動きは，分岐前から分割されていたか，分岐は間違いでそれらは結合すべきものであるかのどちらかである．その判断は，分岐後のトラックを合わせた時の連結仮説の尤度や，分岐前のトラックを分割した場合の連結仮説の尤度などと比較して最適化を行う．

それらの木の最適化が終わった後，仮足による木の最適化を行うことで，細胞本体のみのトラッキングを仮足を含めた細胞全体のトラッキングにすることができる．木の最適化により新たに再構築されたトラック  $E'_{k1}$  が，その要素である細胞本体と仮足を通じてトラック  $E'_{k2}$  といつから繋がりは始めたかによって木を再構成する．

## 5. 評価実験

### 5.1 使用したデータ

本研究では，二光子励起顕微鏡による観測で得られた時系列の生体画像を対象とし，その詳細を表 2 に示す．対象生体画像は，骨粗鬆症を発生したマウスの頭蓋内部の生体画像であり，このうち 2 つは治療薬を投与した際の画像，1 つは投与前の画像である．

### 5.2 評価手法

提案手法の評価を行うために，対象画像の上に正解データの領域分割を赤色，提案手法による領域分割を青色で描画し，その例を図 7 に表示した．提案手法とグラフカットについて，それぞれの対象画像の正解データと比較した際の再現率，適合率，F 値を表 3,4 に記す．

### 5.3 考察

対象画像 1 と 3 の適合率が対象画像 2 と比べて低くなった原因は，対象画像 1, 3 の正解データのうち画面端に存在

表 1  $B_t$  と  $B_{t-1}$  の関係

	大きく差がない	大きく差がある
半分以上重複	つながっている	分裂もしくは結合している
半分以上	つながっていない	つながっていない

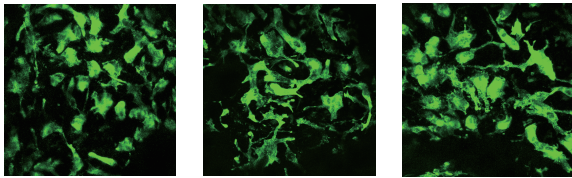


図 4 対象画像 1 図 5 対象画像 2 図 6 対象画像 3

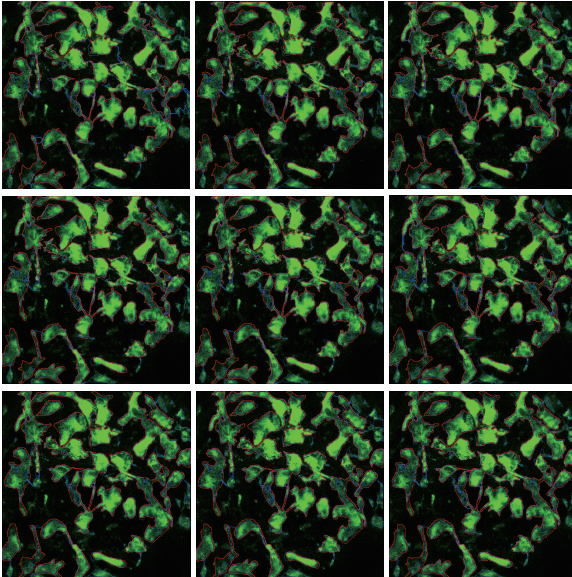


図 7 対象画像 1 の評価 (左上  $t=1$ , 右下  $t=9$ )

する細胞領域について正解が提示されていない箇所があるためだと考えられる。一方、図 8 左の黄色枠に見られるように細胞本体同士が非常に近い位置にある場合、境界を正確に検出できていない。これらの本体の間にも細胞が存在する箇所があり、まとまった大きな領域として判別している箇所が随所にみられる。このような場合に対処するには、仮足を介さない本体同士の結合に関してより厳密に結合の条件を設定する必要がある。

細胞本体に関する未検出の箇所が多く、図 8 右のように

表 2 評価実験における対象画像

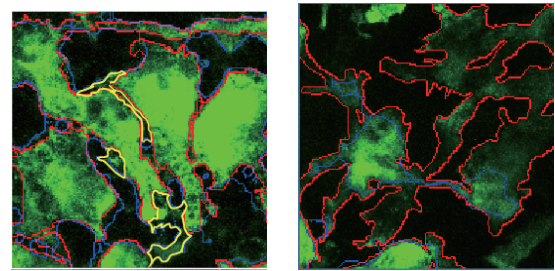
対象	サンプル	解像度	フレーム数 ( $t$ )
対象画像 1	図 4	512*512	21
対象画像 2	図 5	512*512	21
対象画像 3	図 6	511*510	21

表 3 提案手法と正解データの比較

対象	再現率 (%)	適合率 (%)	F 値
対象画像 1	77.1	85.8	0.81
対象画像 2	43.1	96.5	0.60
対象画像 3	87.8	82.9	0.80

表 4 グラフカットと正解データの比較

対象	再現率 (%)	適合率 (%)	F 値
対象画像 1	40.3	94.4	0.57
対象画像 2	25.3	95.4	0.40
対象画像 3	59.1	96.4	0.73



FP FN

図 8 誤検出の例

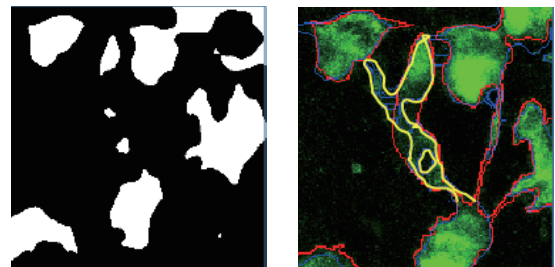


図 9 最適化による仮足の検出例。左：閾値処理で検出された細胞領域，右：最適化による仮足の検出結果

特に明度が低い場合に顕著である。これは細胞検出の際に細胞の尤度を設定する閾値が高かったためだと考えられる。これにより、対象画像 2 では大きく再現率を下げている。明度が低い箇所について正確なトラックの作成を行うために、単純に閾値を下げるのではなく、明度の変化に注目することで、細胞の先端に向かうほど明度の下がるような細胞本体についてその本体全体の検出ができるようになる。

図 9 右は、仮足により細胞がつながっている箇所である。また、図 9 左は、その際に検出していた本体と仮足の位置である。このように検出の際には離れている細胞が、仮足による連結や時系列での最適化によって、一つの細胞であると追跡することができている。このことから、細胞の潜在的な部分を考慮した追跡ができているといえる。

## 6. おわりに

本論文では、破骨細胞をアメーバ状細胞とし、細胞の位置の推定とその追跡を行う手法の提案し、またその評価について述べた。提案手法は、アメーバ状細胞画像を「本体」、「仮足」、「背景」のつにモデル化することで、検出に現れない潜在的な細胞の存在を尤度という形で表現した。また、GDA を用いて細胞の追跡を行うことで潜在的な細胞による本体同士や仮足同士の繋がりを表した。さらに、提案手法を 3 つの生体画像についての正解データと比較評価した結果、一番高いもので再現率 88%、適合率 83%となった。グラフカットを正解データと比較すると、再現率 59%、適合率 96%であり、提案手法は再現率で大きく上回った。また、グラフカットでは検出できなかった潜在的な細胞の一部について検出できたと思われる領域分割も見られた。

細胞のモデル化の際に、仮足のがつながらる距離・明度の

閾値や細胞本体のサイズの閾値などを設定する必要がある，これを学習し，自動で与えることができればより人の手間を減らすことが可能となる．提案手法では，尤度の与え方をそれほど複雑にしなかったが，画像内における輝度の変化などに注目することで解消できる可能性がある．そのためには，専門家が判断する際の基準を言語化し，モデルに組み込むことが必要である．

#### 参考文献

- [1] DOJIN NEWS, “「蛍光生物学」の最前線 7-2,” <http://www.dojindo.co.jp/letterj/144/review/03.html>, 最終アクセス 2016 年 2 月 5 日.
- [2] 独立行政法人科学技術振興機構, “世界初破骨細胞が骨を壊す様子のライブイメージングに成功-関節リウマチや骨粗鬆症, がんの骨転移に対する理想的治療法開発に光-,” <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130117/>, 最終アクセス 2016 年 2 月 5 日.
- [3] Cell Tracking Challenge, <http://www.codesolorzano.com/celltrackingchallenge/Cell-Tracking-Challenge/Welcome.html>, 最終アクセス 2016 年 2 月 5 日.
- [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] Bise, R, Yin, Z, and Kanade, T, “RELIABLE CELL TRACKING BY GLOBAL DATA ASSOCIATION”, The IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, 2011 .
- [6] Kikuta, J, Wada, Y, Kowada, T, Wang, Z, Ge-Hong-Sun-Wada, Nishiyama, I, Mizukami, S, Maiya, N, Yasuda, H, Kumanogoh, A, Kikuchi, K, Germain, R, Ishii, M, “Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function”. The Journal of Clinical Investigation, 2013.