

オプティカルフローを用いた3次元生体イメージングデータからの細胞動態の解析

藤代 昂希¹ 瀬尾 茂人² 竹中 要一² 古家 雅之^{3,4} 菊田 順一^{3,4} 石井 優^{3,4,5} 松田 秀雄^{2,a)}

概要：今日では医学・薬学分野における研究促進のため、バイオイメージング技術によって観察された細胞の動画像を情報処理技術を用いて自動的かつ定量的に解析を行う手法が求められている。本研究ではオプティカルフローを用いて3次元の細胞動態を解析し、Von Mises-Fisher分布を用いた角度統計処理を加えた手法を提案する。実験では破骨細胞・骨芽細胞の観察画像の解析を行い、統計データの可視化を行うことで投薬前後・細胞間における動態の違いを明確にした。

キーワード：生体イメージング, オプティカルフロー, 3次元, 細胞動態, 角度統計

A method for analysis of cell dynamics in 3-dimensional Bioimaging data based on using Optical Flow

KOKI FUJISHIRO¹ SHIGETO SENO² YOICHI TAKENAKA² MASAYUKI FURUYA^{3,4} JUNICHI KIKUTA^{3,4}
MASARU ISHII^{3,4,5} HIDEO MATSUDA^{2,a)}

Abstract:

It is very important to establish the automatic and quantitative analysis of cell dynamics as method for development in medicine and pharmacy fields. Now, we propose a method using 3D-Optical Flow and Von Mises-Fisher distribution. In the test, we applied it to Osteoclast and Osteoblast and detected the difference between osteoclast and osteoblast, and between control and treated.

Keywords: Bioimaging, Optical Flow, 3-dimensional, cell dynamics, Directional statistics

1. はじめに

医療や創薬などの分野において、組織や細胞などの状態・動態を把握することは非常に重要である。生きた細胞の動

態を直接観察できることは、薬剤投与の成否確認や病状の把握に直接貢献する。そのため生体内の観察を正確に早く行える手法が必要とされ、光学顕微鏡や蛍光標識などの技術が病気などの究明に役立てられてきた。医学・薬学の発展は常に、バイオイメージング技術の発展と共にあった。

近年、そのバイオイメージング技術の発展は目覚ましく、細胞や組織を殺すことなく、鮮明かつ長時間の観察が可能となっている。これまで解明されてこなかった様々な仕組みが判明するその一方で、得られる動画像データも膨大になり、人間の手で解析を行うことが困難になってきている。また細胞の動態には複雑なものも多く、人間による分析の恣意性が加わることで正しく細胞の状態を把握できない場合もある。そのため、計算機を用いた自動的かつ定量的な解析が必要とされるようになった。

¹ 大阪大学基礎工学部情報科学科
Department of Information and Computer Sciences, School of Engineering Science, Osaka University

² 大阪大学大学院情報科学研究科
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

³ 大阪大学大学院生命機能研究科
Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

⁴ 大阪大学大学院医学系研究科
Graduate School of Medicine, Osaka University

⁵ 大阪大学免疫学フロンティア研究センター
WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

a) matsuda@ist.osaka-u.ac.jp

本研究では、細胞の3次元蛍光画像に対してオプティカルフローを用いて解析を行う。また、得られたオプティカルフローの結果に統計処理を加えることで、投薬前後における細胞動態の差異の分析を行う。

本稿では、次節で関連研究を紹介した後、3節で用いたオプティカルフローの手法と統計処理について述べる。4節では実験について触れ、5節で考察を行い、6節でまとめと今後の課題について述べる。

2. 細胞動態の解析手法

細胞動態を解析することの意義は、細胞の持つ特性や状態を理解することにある。細胞は分裂や移動など様々な動きをとるため、目的とする動態を解析するには適した手法を選択しなくてはならない。例えば免疫系の観察を行う際など、対象の移動速度や移動頻度に着目する場合は、トラッキングを行い動きの追跡をする方法が用いられる。[1] また形態の変化に着目する場合は、細胞の輪郭を抽出し差分をとることでその時間変化を計算する[2]、といった方法が用いられる。その他、癌細胞など分裂の趨勢を確認したい場合などは、個体を特定するためのセグメンテーションが頻繁に用いられる[3]。

こうしたイメージングデータから細胞動態の解析を行うための手法には様々なものがあるが、その中でもオプティカルフローは重要な手法の一つとして広く知られており、様々な細胞動態の解析において用いられている[4][5][6]。オプティカルフローはオブジェクトの移動をベクトルで表現したものであり、ピクセル単位での解析ができるため情報量に富んだ結果を得ることができる。そのため輪郭が曖昧だったり、形状が変化した複雑な動きを見せる細胞画像に対しても上手く適用でき、その後の情報処理次第で詳細な動態解析を行える手法である。Lucas-kanadeなどの著名なオプティカルフローの手法は3次元に拡張されており[7]、2次元と比較して精度向上を果たした手法も提案されている[8][9]。しかし3次元における解析では必然的に計算量が問題になり、次元が増えることによって直感的な動態の理解も困難になる。そこで以下では計算速度の向上を図った手法に、実験対象の特徴を把握するための統計処理を加えた手法を提案している。

本研究では、オプティカルフローを用いて3次元画像の解析を行う。最大値投影法によって2次元に落とし込んだ画像ではなく、3次元のまま解析を行うことでより正確な解析結果を得ることが期待できる。

3. 提案手法

この節では、3次元オプティカルフローを用いた細胞動態の解析手法を提案する。図1に提案手法の概要を示す。



図1 提案手法の概要

Fig. 1 Outline

本研究ではsuper-voxelsを用いて計算速度向上を図ったオプティカルフローの解析手法[10]を使用する。その後、得られたオプティカルフローを対象にVon Mises-Fisher分布を用いた統計解析を行う。

以下、用いる単語としてvoxelを定義する。これは3次元画像を扱う際に単位として、2次元におけるpixelを代用したものである。

3.1 オプティカルフローの計算

3.1.1 計算のための準備

2次元と比べ、3次元では計算量が非常に膨大になる。そこで計算量を減らすための様々な工夫が必要になる。用いた手法では大きく分けて4つの準備を行うことで計算量を減らすことに成功している。

まず始めに、細胞と背景とを大まかに切り分ける画像の二値化を行う。二値化処理の際にはMomentsのアルゴリズム[11]を用いる。この分離作業を行うことによって、細胞が存在するボクセルのみを対象に計算を行うことができ、大幅に計算量を減らすことができる。また背景中に存在するノイズを計算対象から外すことができるため、計算精度を高めることにもつながる。なお、二値化画像は多分にノイズを含んでいるため、スペckルノイズ除去を行い処理の精度を上げる。

次に、空間における幾何学距離と輝度を基にsuper-voxelsを生成する[12]。super-voxelsとは性質が近いボクセルが集まった小領域のことで、処理を行う通常のボクセルをこのsuper-voxelsに置換し、小領域をまとめて一つのvoxelとして処理することで計算量を減らすことができる。このsuper-voxelsの生成には、同論文で提案されているSimple

linear iterative clustering (SLIC) を用いる。SLIC は k-means 法を利用したアルゴリズムであり、各クラスタの中心を求める際に勾配の緩やかなボクセルを選択する、あらかじめ制限された領域内に存在するボクセルのみ対応付ける、という 2 つの特徴によって高速に super-voxels の生成を行うことができる手法である。

super-voxels の生成が終わり次第、隣接した super-voxels (中心間距離が閾値未満のもの) 同士の対応付けを行う。対応付けられた super-voxels は同一方向に移動するものとして今後の計算を行う。この処理によって計算量の減少だけでなく、計算精度の向上も期待できる。これは繋がっていないが密接した動きをする細胞が頻出するためである。

最後に、解像度を $1/2, 1/4, 1/8, 1/16$ に落とした計 4 つのガウシアン・ピラミッド画像を用意する。解像度の低いピラミッド画像から順に計算を行い、次のピラミッド画像の計算に前の計算結果を利用することで計算精度を高めることができる。また探索領域を絞ることで計算速度向上にもつながる。

以上の準備を終えた上で、オプティカルフローの計算を行う。

3.1.2 3次元におけるオプティカルフロー

以下の最適化問題を解くことによって、求めたいフローの結果を得る。

$$\arg \min_{v_1 \sim v_l | \mathbf{R}} \sum_{p \in \mathbf{R}} \sum_{s \in \mathbf{S}} \rho_D(I_p^t - I_p^{t+1} + v_s) + \lambda \sum_{s \in \mathbf{R}} \sum_{r \in \mathbf{N}(s)} W_{r,s} \rho_C(v_s - v_r) \quad (1)$$

$\mathbf{R}$ は生成された super-voxels の集合、 $\mathbf{S}$ は特定の super-voxels で、 p は特定のボクセルである。また ρ_D と ρ_C は共にコストを表し、Huber 損失を用いている。最終的には上式を満たすボクセルのフロー V_s の集合を求める。

左の項は一般的なオプティカルフローの計算に利用される移動前後の輝度値 I の比較である。移動前後のボクセルの輝度値が近ければ近いほど左項の値は小さくなり、最適化問題の解に近づく。しかし考慮するのが輝度値のみとなると、遠く離れた別の細胞のボクセルと結びつけてしまったりと正確な解析が期待できない。そこで比較範囲の制限を目的に右項を設ける。右項では、あらかじめ閾値を設けて作成した隣接 super-voxels とのフローを比較する。もし隣接 super-voxels とフローが大きく異なる場合 (同一方向ではなく違う方向を向いていた場合など) は値が大きくなる。このように式を設定することで、移動前後で輝度値が近く、かつ外れ値を回避した範囲でフローの探索ができる。

$W_{r,s}$ は重みで、次式のように表される。

$$W_{R,S} = \exp \left\{ -0.5 \left(\frac{d_{R,S}}{d_{max}} \right)^2 \right\} \frac{vol(R) + vol(S)}{2 \max_{A \in \mathbf{R}} \{ vol(A) \}} \quad (2)$$

d_{max} は事前に設けた閾値、 $d_{r,s}$ は隣接 super-voxel 間のユークリッド距離である。vol はそれぞれの super-voxel 内

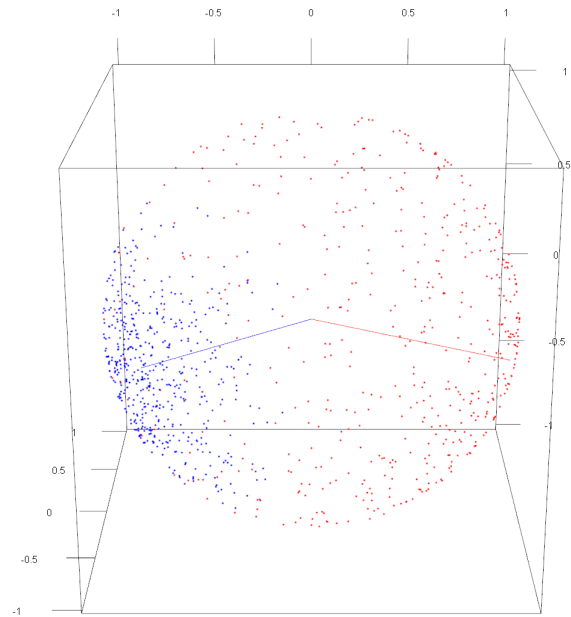


図 2 Von Mises-Fisher 分布の例

Fig. 2 Example of Von Mises-Fisher distribution

に含まれるボクセルの数を表す。この式から閾値 d_{max} が大きくなるにつれて重みが増し、反対に $d_{r,s}$ が大きくなる、つまりボクセル R と S が離れるにつれて重み $W_{R,S}$ の影響力は小さくなる事が分かる。

3.2 オプティカルフローの解析

3.2.1 統計処理のための準備

フロー全体をまとめて解析すると、反対の動きをする細胞のフロー同士が打ち消しあって上手く解析できない可能性がある。そこで隣接したボクセルを同一領域 (単一細胞) としてフロー全体を複数のクラスタに分割し、各領域ごとに統計処理を加えることにする。

また動画像を記録する際にブレが発生している場合、ブレ方向へのフローが全ての解析結果に加わることで本来の特徴を打ち消してしまう。そこで正しく解析を行えるよう、最小二乗法を用いたキャリブレーションを行う。解析結果のフローを利用し、全てのフローの二乗和 (= フローの長さの合計値) が最も小さくなるように補正をかける。

3.2.2 Von Mises-Fisher 分布のパラメータ推定

統計解析では、フローの大きさだけでなく方向にも着目する。これは細胞の動態において方向が意味を持つことがあるため、大きさの解析と合わせることでより正確な分析が期待できるからである。フローデータの方向を分析するためのモデルとして、Von Mises-Fisher 分布を導入する。これは超球上の正規分布と呼ばれ、3次元以上のデータの方向統計において頻繁に用いられる分布である。

Von Mises-Fisher 分布は以下の確率密度分布を持つ。

$$f_p(\mathbf{x}; \mu, \kappa) = \mathbf{C}_p(\kappa) \exp(\kappa \mu^T \mathbf{x}) \quad (3)$$

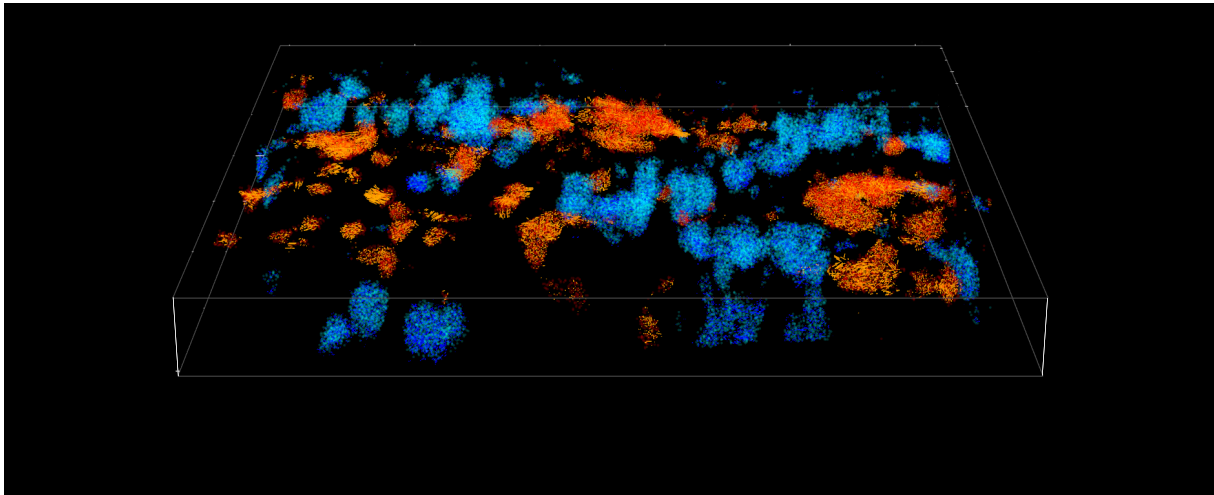


図 3 破骨細胞 (赤)・骨芽細胞 (シアン) とそれらのオプティカルフロー (オレンジ・青)

Fig. 3 Osteoclast(red)/blast(cyan) and their optical flow

$C_p(\kappa)$ は次のように定義される.

$$C_p(\kappa) = \frac{\kappa^{p/2-1}}{(2\pi)^{p/2} I_{p/2-1}(\kappa)} \quad (4)$$

I は第一種変形 Bessel 関数, d は次元, μ は平均ベクトル, $\kappa > 0$ は μ 方向への分布の集中度を表すパラメータである. κ が大きいほどデータ全体が μ 方向に集中し, 反対に 0 に近いほど均一分布に近づく.

図 2 が球上に確率密度関数をプロットした例である. 赤が κ が 1 の時, 青が κ が 10 の時の分布を表す. 線分は正規化された平均ベクトル μ であり, 分布全体の平均方向を示す. κ の大きい青の方が, プロットが平均ベクトル周辺に集まっていることが分かる. 本研究では, κ を細胞の動きの進行方向への集中度を表すパラメータとして用いる. また, $|\mu|$ を平均ベクトルの長さとして定義し, これを細胞の動きの激しさを表すパラメータとして用いる. 各領域における 2 つのパラメータ κ と μ を求め, 外れ値としてボクセル数が閾値 (本研究では $3 \times 3 \times 3 = 27$ とした) よりも少ないクラスタを除外したものを最終的な解析結果とする.

4. 実験

上記手法を用いて細胞の動態を解析し, 統計分析・可視化を行う. 研究環境は ubuntu で, 二値化処理やノイズ除去などの計算準備には全て ImageJ を, 計算後の統計処理には R を用いた. また, Von Mises-Fisher 分布のパラメータ計算には R のパッケージ Directional[13] を, 可視化には rg1[14] を用いた.

4.1 入力データとフローの計算結果

実験に用いたのは, 二光子励起顕微鏡を用いて撮像したマウスの頭蓋骨部の破骨細胞 (Osteoclast)・骨芽細胞 (Osteoblast) である. 投薬前の通常時の細胞画像と, 治療

薬を投入し 3 週間経過した状態の細胞画像を入力とする. 実験データは $512 \times 512 \times 50$ [voxel] の解像度を持つ 3 次元画像を 97 フレーム分含んだ nd2 ファイル形式である. 投薬前後でそれぞれ 6 つのデータがあり, それら計 12 個を入力として提案手法による解析を行う.

図 3 に, 解析結果のフローの例を示す. 赤が破骨細胞, シアンが骨芽細胞を表し, オレンジと青がそれぞれのフローを表す.

4.2 オプティカルフロー解析の結果

以下, 破骨細胞・骨芽細胞それぞれの投薬前・投薬後における解析結果を示す.

4.2.1 破骨細胞・骨芽細胞の細胞動態の違い

図 4 は投薬前, 図 5 は投薬後の各実験条件において, 破骨細胞・骨芽細胞のクラスタの細胞動態を表すパラメータの, 進行方向への集中度を κ を横軸に, 動きの激しさ $|\mu|$ を縦軸にプロットしたものである.

両図からは, 破骨細胞に対して骨芽細胞の方が κ の大きいクラスタが多いことが見て取れる. 逆に破骨細胞の方が骨芽細胞よりも比較的 $|\mu|$ が大きいクラスタが多い.

4.2.2 投薬による影響

表 1 は各領域におけるクラスタ数の合計と平均, κ の平均と $|\mu|$ の平均の大きさである. 図 4 と図 5 で傾向が示されていたように, 破骨細胞が骨芽細胞よりも κ で低い値, $|\mu|$ で高い値を示している. また, 投薬後には破骨細胞・骨芽細胞が共に κ と $|\mu|$ を減少させていること, 骨芽細胞について, 投薬以前に比べて投薬後の方がクラスタの数が増加傾向にあるのが分かる.

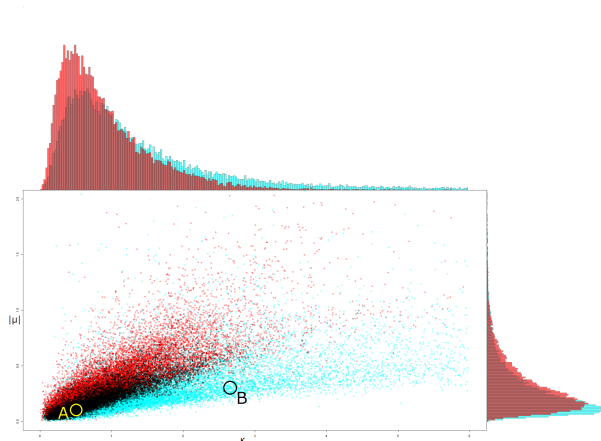


図 4 投薬前の破骨細胞 (赤)・骨芽細胞 (シアン)
Fig. 4 control:osteoclast(red)/blast(cyan)

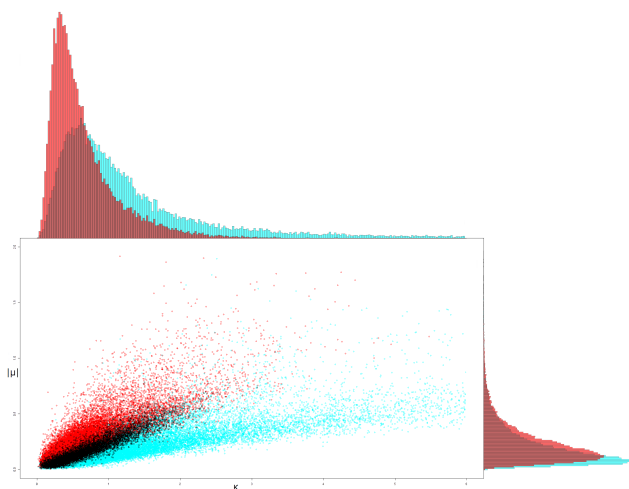


図 5 投薬後の破骨細胞 (赤)・骨芽細胞 (シアン)
Fig. 5 Treated:osteoclast(red)/blast(cyan)

表 1 投薬前後における破骨細胞 (Clast)・骨芽細胞 (Blast) の 1 画像あたりのクラスタ数, 平均 κ と平均 μ の長さ

Table 1 Compared control and treated osteoclast/blast for number of cluster, mean of κ and length of $\bar{\mu}$

	投薬前		投薬後	
	Clast	Blast	Clast	Blast
クラスタ数	28243	24417	28920	28800
平均クラスタ数	48.5	41.9	49.7	49.5
$\bar{\kappa}$	1.084	1.878	0.829	1.562
$ \bar{\mu} $	0.305	0.268	0.245	0.21

5. 考察

5.1 クラスタ数の増加について

骨粗しょう症治療薬は, 投薬を行うことで骨生成を促進する. 解析過程でクラスタリングを行った際, 投薬前に比べて投薬後の骨芽細胞のクラスタ数が増えたという結果は, 投薬によって骨芽細胞が増大した, つまり投薬の効果があったことを示すと考えられる.

5.2 細胞動態のパラメータについて

解析結果から, 実験データには以下の特徴的な動きをする細胞が出現することが予想される.

- (1) 異なる方向に輪郭を変化させる細胞
- (2) 同一方向へと動く細胞

これらの動きはそれぞれ (1) が図 4 の A, (2) が図 4 の B に対応している.

図 6 と図 7 は, (1) (2) それぞれの動きをしていると思われる細胞を示したものである. また図 8 と図 9 はそれぞれのオプティカルフローの方向分布である.

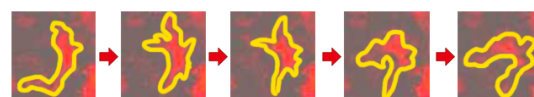


図 6 異なる方向への動き (図 4 の A)
Fig. 6 Motion with different direction(Fig.4-A)

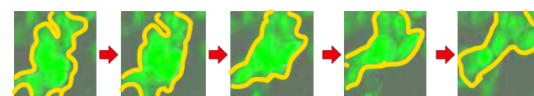


図 7 同一方向への動き (図 4 の B)
Fig. 7 Motion with same direction(Fig.4-B)

図 6 では細胞自体は動かず, 周囲に手足を伸ばすようにして動いているのが分かる. 一方の図 7 では細胞が大きく一方向に移動しているのが分かる.

分布はそれらの特徴を如実に示しており, 図 8 はほぼ均一分布となっており, 9 は μ 方向に分布が偏っている.

投薬前の破骨細胞には (1) の動きをとる個体が多く, 一方の骨芽細胞には (2) の動きをとる個体が多いことが推測できる. 投薬後の破骨細胞は (1) の動きをする細胞が増加しているが, 骨芽細胞は (2) の動きをとる細胞が減り, 逆に (1) の動きをする細胞が増えている.

以上, まとめると,

- 破骨細胞は異なる方向に輪郭を変化させる個体が多く, 骨芽細胞は同一方向へと動く個体が多い
- 投薬後は破骨細胞・骨芽細胞共に異なる方向に輪郭を変化させる個体が増加する傾向がある

6. まとめ

本稿では, オプティカルフローと統計処理を用いて 3 次

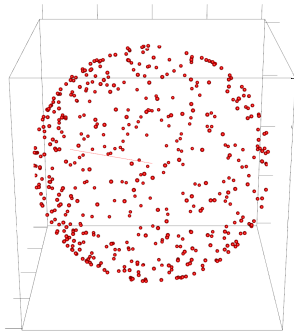


図 8 図 6 のオプティカルフローの方向分布
($\kappa = 0.49$)

Fig. 8 Distribution of flow direction:Fig6
($\kappa = 0.49$)

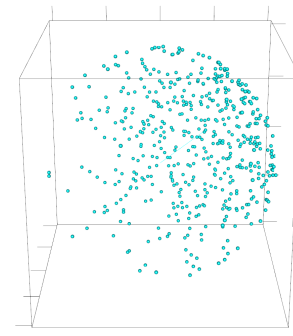


図 9 図 7 のオプティカルフローの方向分布
($\kappa = 2.74$)

Fig. 9 Distribution of flow direction:Fig7
($\kappa = 2.74$)

元の細胞動態を解析する手法を提案した。結果として、細胞の種類・投薬前後に応じて細胞動態の特徴の分析を行うことができた。

今後の課題として、クラスタリングの最適化による計算精度の向上が挙げられる。現状、ボクセル数の極端に少ないクラスを外れ値として除外して計算を行っているが、その際に計算に加えるべきはずの特徴を持ったクラスまで排除してしまっている。クラスタリングには二値化した画像を利用しているので、二値化処理の際のアルゴリズムを見直すことで改善を期待できる。

謝辞 本研究は JSPS 科研費 15K00403 の助成を受けたものです。

参考文献

- [1] Rashidi, N. M., Scott, M. K., Scherf, N., Krinner, A., Kalchschmidt, J. S., Gounaris, K., Selkirk, M. E., Roeder, I. and Celso, C. L.: In vivo time-lapse imaging shows diverse niche engagement by quiescent and naturally activated hematopoietic stem cells, *Blood*, Vol. 124, No. 1, pp. 79–83 (2014).
- [2] Kikuta, J., Wada, Y., Kowada, T., Wang, Z., Sun-Wada, G.-H., Nishiyama, I., Mizukami, S., Maiya, N., Yasuda, H., Kumanogoh, A. et al.: Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 123, No. 2, pp. 866–873 (2013).
- [3] Di Cataldo, S., Ficarra, E., Acquaviva, A. and Macii, E.: Achieving the way for automated segmentation of nuclei in cancer tissue images through morphology-based approach: a quantitative evaluation, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol. 34, No. 6, pp. 453–461 (2010).
- [4] Guo, D., Van de Ven, A. L. and Zhou, X.: Red blood cell tracking using optical flow methods, *Biomedical and Health Informatics, IEEE Journal of*, Vol. 18, No. 3, pp. 991–998 (2014).
- [5] Boric, K., Orto, P., Viéville, T. and Whitlock, K.: Quantitative analysis of cell migration using optical flow, *PLoS one*, Vol. 8, No. 7, p. e69574 (2013).
- [6] Brox, T., Bruhn, A., Papenberger, N. and Weickert, J.: High accuracy optical flow estimation based on a theory for warping, *Computer Vision-ECCV 2004*, Springer, pp. 25–36 (2004).
- [7] Barron, J. L. and Thacker, N. A.: Tutorial: Computing 2D and 3D optical flow, *Imaging Science and Biomedical Engineering Division, Medical School, University of Manchester* (2005).
- [8] Ronot, X., Doisy, A. and Tracqui, P.: Quantitative study of dynamic behavior of cell monolayers during in vitro wound healing by optical flow analysis, *Cytometry*, Vol. 41, No. 1, pp. 19–30 (2000).
- [9] Lombardot, B., Luengo-Oroz, M., Melani, C., Faure, E., Santos, A., Peyrieras, N., Ledesma-Carbayo, M., Bourguin, P., de Neurobiologie Alfred Fessard, G.-s. and Yvette, F.: Evaluation of four 3d non rigid registration methods applied to early zebrafish development sequences, *MIAAB MICCAI* (2008).
- [10] Amat, F., Myers, E. W. and Keller, P. J.: Fast and robust optical flow for time-lapse microscopy using superpixels, *Bioinformatics*, Vol. 29, No. 3, pp. 373–380 (2013).
- [11] Tsai, W.-H.: Moment-preserving thresholding: A new approach, *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, Vol. 29, No. 3, pp. 377–393 (1985).
- [12] Achanta, R., Shaji, A., Smith, K., Lucchi, A., Fua, P. and Susstrunk, S.: SLIC superpixels compared to state-of-the-art superpixel methods, *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, Vol. 34, No. 11, pp. 2274–2282 (2012).
- [13] Tsagris, M. and Athineou, G.: *Directional: Directional Statistics* (2015). R package version 1.5.
- [14] Adler, D., Murdoch, D. and others: *rgl: 3D Visualization Using OpenGL* (2015). R package version 0.95.1429.