

マルチチャンネル蛍光顕微鏡動画のための パーティクルフィルタを用いた細胞追跡手法

小森 康祐[†] 瀬尾 茂人[‡] 間下 以大[§] 竹中 要一[‡] 松田 秀雄[‡]

概要：近年、バイオイメーjing技術の進歩によって、様々な条件下での細胞や組織を高並列かつ長時間の動画として観察することが出来るようになってきている。また様々なタンパク質の発現にそれぞれ異なる蛍光色素をプローブとしてカップリングする技術も進展しており、創薬研究における薬剤候補の選別や生命科学における表現型解析などへ応用されている。大量の動画から、様々な特徴量を抽出し細胞の特性の変化を定量的に解析するためには、自動的に精度良く細胞の追跡を行う必要がある。本研究では、複数種類の蛍光標識により多重染色された細胞をマルチチャンネルの蛍光顕微鏡で経時観察して得られる動画を対象として、パーティクルフィルタを用いた細胞の追跡手法を提案し、その有効性を評価するとともに得られた結果の考察を行う。

キーワード：細胞画像、生物画像処理、細胞追跡、パーティクルフィルタ

1. はじめに

細胞・組織などの動態を画像として解析する技術であるバイオイメーjingは、近年目覚ましい発展を遂げている。細胞や粒子を観察するためには、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、蛍光タンパク質を用いた蛍光顕微鏡などが用いられる。特に Fucci (Flourescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) [1]は、細胞周期を可視化するための蛍光プローブで、細胞へ導入することで細胞周期の各状態に応じて、細胞核内に赤と緑の蛍光タンパク質を発現させる。これを赤色と緑色の波長を検出するマルチチャンネルの蛍光顕微鏡で観察することで細胞周期の進行をリアルタイムに観察することができる。

Fucci 細胞を観察することで、細胞がどの状態にあるか判別することが可能となり、薬剤が細胞に与える影響や細胞の挙動の調査を行うことが出来る。しかしながら、細胞増殖や薬剤応答などの生命現象における細胞周期の時間的、空間的なパターンを詳細に解析するためには、まずは動画中から個々の細胞を経時的に追跡する必要がある。得られた動画像を全て手作業で処理することは困難であり、画像処理技術により細胞の自動追跡・状態推定を行う技術の開発が

必要とされている。一般に細胞や粒子の追跡を行う手法としては、フレームの前後での対応関係を最適化問題として解き移動軌跡を推定するトラッキングベースの手法や、パーティクルフィルタを用いることで複数のオブジェクトを同時に追跡するフィルタリングベースの手法などが提案されている。自動追跡を行う際には対象細胞の特徴に応じて手法が使い分けられているが、一般に共通して考慮すべき問題として、形状や輪郭があいまいで、よく似た細胞が同一視野内に多数存在し、また細胞分裂や細胞死する際にその形状を変化させる点などが挙げられる。

従来の Fucci 細胞追跡の手法としては、物体の検出と対応付けに基づく手法が用いられている [2]。まず細胞領域と背景領域を分割 (セグメンテーション) し、次に作成されたオブジェクトに最近傍法などを用いて、フレームの前後で関連付けを行い細胞の移動軌跡を求めるといものである。しかし、Fucci を導入した蛍光細胞は細胞の状態によって各チャンネルの蛍光強度の強弱が変化するため、あるチャンネルでは像が消失するということが発生する。これらの画像はセグメンテーションが非常に困難であり、細胞の追跡精度も著しく悪くなるという問題があり、精度の高い追跡手法の開発が求められる。

「A cell tracking method based on particle filter for multi-channel fluorescence microscopy images」

[†] 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

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

[§] 大阪大学サイバーメディアセンター
Cybermedia Center, Osaka University



図 1：Fucci による細胞周期の可視化

2. 提案手法

本研究では、マルチチャンネル蛍光顕微鏡動画を対象とした、パーティクルフィルタに基づく細胞の多点自動追跡とその細胞周期の状態推定手法を提案する。本手法では、対象とする動画においては、各細胞の状態に依存して追跡を行いやすいチャンネルが変化するという点に着目し、細胞周期の各状態に応じてパーティクルフィルタが利用する各チャンネルの情報の重みを変化させる方法を用いた。細胞がどの状態にあるか推定することは、パーティクルフィルタがどのチャンネルを重点的に追跡するかということと一致するため、パーティクルフィルタと状態推定それぞれの精度を向上させることが、全体の精度の向上につながると考えられる。

本手法の概要を図2に示す。まず、細胞周期の各状態のモデル化を行う(STEP1)。目視により細胞周期の各状態の画像を数サンプルずつ選択し、計 n 個の各チャンネルの輝度情報に応じて、各状態をそれぞれ別個の n 次元正規分布としてモデル化する。すなわち細胞周期の状態を $S = \{s_1, \dots, s_k\}$ の k 個としたとき、各モデルを確率密度関数 $f_k(x|\theta_k)$ として定義する (θ_k は n 次元正規分布のパラメータ)。次に粒子の初期散布を行う。初期フレームにおいて確認できた細胞核の中心座標を抽出し、抽出した全ての座標に関して、その周辺にそれぞれ m 個の粒子を散布する(STEP2)。

STEP3 では、細胞の状態推定と追跡を行う。まず粒子について状態推定を行い、その粒子の状態集合から細胞周期の状態推定を行う。それにより重点的に利用するチャンネルを決定し追跡を行う。粒子の状態推定としては、各チャンネルの輝度情報ベクトルを $x = (i_1, \dots, i_n)$ とすると、その粒子の各モデルへの当てはまり具合は、 $p_k = f_k(x|\theta_k)$ で表すことができ、この確率が最大となるモデルを粒子の状態とする(STEP3-1)。

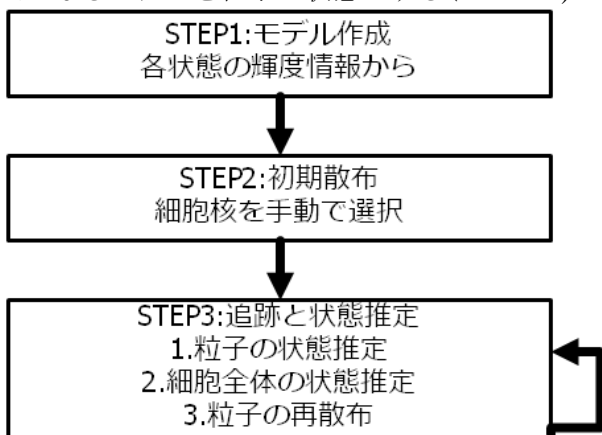


図2：追跡の流れ

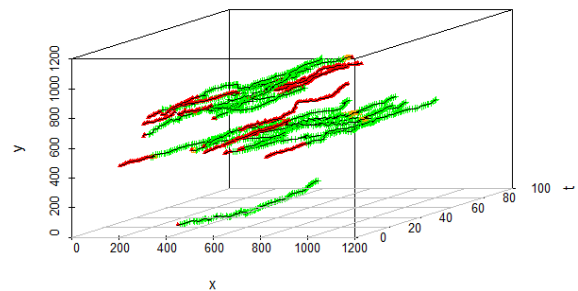


図3：細胞の状態と移動の軌跡

次にある細胞について前でもとめた粒子の状態の集合を入力とし、前フレームの状態に応じた重み付き多数決により細胞の状態を推定する(STEP3-2)。最後に細胞の状態と同じ状態の粒子の座標から重心をもとめ細胞の中心とする。その後、その座標周辺へ粒子を再散布する(STEP3-3)。この手順を繰り返すことで、細胞の状態推定と追跡が行われる。

3. 結果

癌細胞に Fucci ベクターを導入し、赤、緑、微分干渉像の3チャンネルでタイムラプス撮影を行った100フレームの動画像に対して、本手法を適用した。細胞の初期位置は目視で判別し各細胞に対して $m = 100$ 個の粒子を散布した。図3は追跡と状態推定の結果であり、細胞の移動軌跡と、細胞の状態を色で表し、細胞の動態を3次元で表現したものである。x軸 y軸がそれぞれ元画像のx座標 y座標、z軸が時間軸を表している。精度は目視と比べて90.3%であった。

4. 終わりに

本研究ではパーティクルフィルタを用いて、マルチチャンネル蛍光顕微鏡動画における細胞の自動追跡と状態の推定を同時に行う手法を提案した。モデルデータを増やすことで、細胞分裂や細胞死の状態推定についても期待できる。今回初期散布は手動で行ったが、これを自動で行う手法の開発が望まれる。加えて視野外から新たに出現した細胞や、視野内から消滅する細胞に対する粒子の再散布を手法に組み込むことによる追跡精度の更なる向上が期待される。

参考文献

- [1]Sakaue-Sawano, Asako, et al. "Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression", *Cell*, Vol.132, No.3, pp.487-498 (2008).
- [2]Downey, Mike J., et al. "Extracting fluorescent reporter time courses of cell lineages from high-throughput microscopy at low temporal resolution", *PLoS one*, Vol.6, No.12 (2011).