

# 顕微鏡画像に基づく癌細胞計数システムの構築

山田圭祐<sup>†</sup> 郭 清蓮<sup>†</sup> 小木美恵子<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>金沢工業大学 情報学部

<sup>‡</sup>金沢工業大学 バイオ・化学部

## 1 はじめに

既存の細胞自動計数システムには、高精度な自動計数機能がないため、医学、バイオ科学の研究者たちは手動で細胞をカウントしなければならない。研究者たちの貴重な研究時間を計数のために使われてしまい、また、計数ミスが発生しやすい状況である。そこで、この研究は医学・バイオ研究者たちを支援することを目的として、精度の高い癌細胞計数システムの構築を目指している。具体的な研究目標として、

- (1) 癌細胞の個数を正確に、自動的に数える機能を実現する
- (2) カウントされた細胞をマーキングし、されていない細胞をビジュアル的に区別できるようにする
- (3) カウントされた細胞の個数を数字で表記する
- (4) カウントされた細胞について、その位置情報を記録し、座標値を表記する

このシステムの実現によって、研究者たちが手動で癌細胞を数える手間が省き、研究時間の短縮に役に立つ。また、自動計数アルゴリズムでは処理できない複数の細胞が複雑に重なる部分に対して、手動で計数・マーキングできる機能を搭載する。このように自動計数アルゴリズムの誤差を修正できる機能を備える、よって、研究者たちに信頼されるシステムを提供する。

## 2. 既存研究

癌細胞は大きく2種類に分けられる：浮遊細胞と呼ばれる丸い形をしたものと接着細胞(平細胞)と呼ばれる三角形や長細い形をしたものである。平細胞には多くの種類があり、様々な複雑な形をしている[1][2]。

浮遊細胞は丸い形をしているため、既存の楕円検出アルゴリズムを用いて、簡単に検出できると思われるが、実際の実験結果は予想と違って20%ほどの誤差が生じている。平細胞の場合、領域抽出や輪郭抽出のアルゴリズムを統合して利用しても、うまく抽出できないケースが多い。その原因として、

- 顕微鏡の元画像の鮮明度とコントラストが弱い
- 細胞内部が非均一であるため、色や濃淡の変化は細胞の輪郭抽出に影響を与えている
- 細胞同士の重なりが多い。平細胞なら常に重なりが起きている状態である。

などが挙げられる。既存のアルゴリズムを用いるだけでは、高精度の自動計数結果が得られないことが分かった。

本研究は細胞核の抽出とその位置情報の利用に注目している。各細胞に一つの細胞核がある。顕微鏡写真を撮る際、細胞が染色されたため、細胞核が輝度のたかい蛍光点として現れる。複数の細胞が重なっている領域では、すべての細胞核が見えるはずではないが、一部の細胞核が見える。複数の細胞の塊の面積と輪郭線、および細胞核の蛍光点の数など多様なデータを総合的に分析することによって、細胞の数を推定するアルゴリズムを構築したいと研究を進めている。

## 3. 研究の計画と方法

まず浮遊細胞を対象に自動抽出アルゴリズムを研究・開発する。細胞核の見える細胞を先に塊から取り出し、連結領域から切り出す。残りの部分について、その輪郭線の長ささと総面積の関係に基づく細胞数と細胞核位置を推定する数学モデルを構築する。この細胞計数アルゴリズムを細胞核収束計数アルゴリズムと呼ぶ。

細胞核収束計数アルゴリズムを実現するために、以下の画像処理のプロセスが必要としている[3]：

- 画像前処理
  - 連結領域の抽出
  - 楕円領域の抽出。結果として、重なりのない浮遊細胞が抽出される。
- マスクを作り、重なりのある領域だけに対して、更に以下の処理を行う：
- 連結領域の面積を積算する。連結領域の面積と孤立細胞の平均面積の割り算に基づいて推算細胞数を計算する。
  - 連結領域内にある蛍光点を抽出する。

➤ 蛍光点の数と推算細胞数を比較する：ほぼ同じなら、細胞が互いに重なっていても、細胞核が全部見えていると判断し、蛍光点の数を細

Automatic Counting Based on Microscope Images of Cancer Cells

<sup>†</sup> Keisuke Yamada · Kanazawa Institute of Technology

<sup>†</sup> Qinglian Guo · Kanazawa Institute of Technology

<sup>‡</sup> Mieko Kogi · Kanazawa Institute of Technology

胞数とする。

- ▶ 蛍光点の数は推算細胞数より大きい場合、蛍光点の数を細胞数だと判断する。
- ▶ 蛍光点の数は推算細胞数より少ない場合、更に以下の処理を行う。
  - ◆ 連結領域輪郭線上の点は必ず一つ以上の細胞核に対応している。浮遊細胞の場合は、細胞はほぼ円形である特徴を利用して対応付けを行う。輪郭線上の各点はある蛍光点との距離が一定値以下であれば、その蛍光点と対応づける。
  - ◆ ある蛍光点とそれに対応する輪郭線上の点で成す扇型の領域を削除する。削除されるのは、蛍光点に対応する細胞の部分だと考える。残りの領域は細胞核が見えない、複数の細胞が重なっている部分と考える。
  - ◆ 細胞の変形があるため、輪郭線上的の特異点を抽出することによって、残りの部分の細胞の数を推定する。

浮遊細胞に応用した実験では、提案するアルゴリズムの自動計数正確率は平均 75%でした。図 1 は、本システムの細胞自動計数の操作方法を示す。

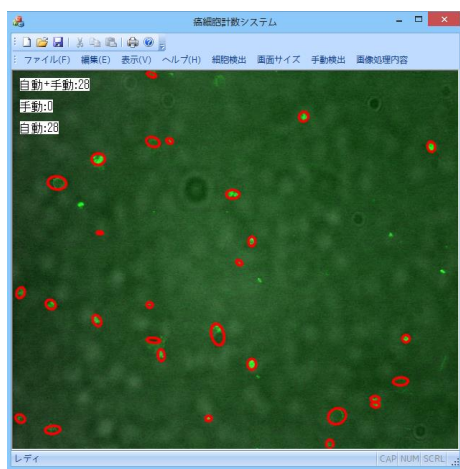


図 1 細胞検出結果

細胞の重なりが複雑で、連結領域の輪郭線にも現れない、かつ、細胞核の蛍光点も画像に現れないという下の層に隠された細胞に関しては、もし、人間の視覚でその存在が判断できるなら、やはり計数しなければならない。そのために、本研究の GUI (Graphics User Interface) には、マニュアル操作による細胞計数機能も備えた。

コンピュータで自動的に計数された細胞には、細胞核の位置に四角が描かれる。研究者が自動計数の結果を確認する際、人間の視覚的な認識と異なるところがあると判断すれば、マニュアル操作でその部分の結果をクリック操作で簡単に変更することができる。図 2 は、手動計数のための GUI

を示す。特別な訓練を受けずに、すぐに使える、慣れやすいシンプルな GUI を構築する必要がある。ここでは、自動検出結果をビジュアルに表示し、ユーザの手動操作と連動するための表示も実現している。この操作の後に画面上をマウスクリックすると、クリックした座標をマークできる。

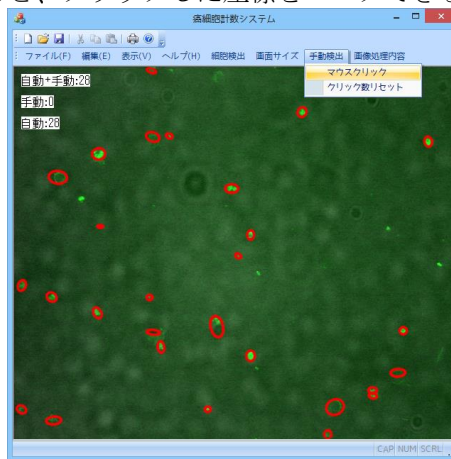


図 2 手動計数の GUI

#### 4. まとめ

本論文は進行中の研究であるが、顕微鏡画像に基づく癌細胞計数システムの構築について報告した。浮遊細胞の顕微鏡画像 5 枚について実験した結果、自動的に 75%の自動抽出と計数ができた。この抽出率を高めるために、更にアルゴリズムの改善と実験を行わなければならない。

また、平細胞から 1、2 種類を選び、細胞の形の特徴に基づく自動計数アルゴリズムを研究しなければならない。また、GUI の構築と抽出アルゴリズムの研究を同時進行で進めたいと考えている。システム開発者はコンピュータやソフトウェアの使用に慣れているため、生物、バイオの研究者たちと異なる習慣が身に付けている。システム開発者ではなく、生物・バイオの研究者たちにとって使いやすいシステムにするために、バイオの研究者たちにも検証実験に参加してもらおう。

#### 参考文献

- [1] 組織培養の技術 基礎編 日本組織培養学会 編 細胞培養なるほど O&A 羊土社
- [2] 研究テーマ別 動物培養細胞マニュアル 共立出版
- [3] Gary Bradski, Adrian Kaehler, 詳解 OpenCV コンピュータビジョンライブラリを使った画像処理・認識, 株式会社オーム社, 2013 年 10 月 16 日