

炎症刺激に対する免疫細胞の動態解析のための 深層学習に基づく細胞追跡手法

渡部 綾¹ ブライソン ジェームス² 藤本 健二¹ 繁田 浩功¹ 瀬尾 茂人¹ 松田 秀雄^{1,a)}

概要：マウスの生体内での細胞の動態をリアルタイムで観察できる二光子励起顕微鏡を用いて、炎症刺激に対する皮膚の免疫細胞の動態を解析するために、畳み込みニューラルネットワークに基づく物体追跡手法を改良して細胞追跡を行う手法を開発したので報告する。本手法を用いて4種類の炎症刺激に対する免疫細胞の動態を解析し、刺激に対する応答の違いを明らかにすることで、本手法の有効性を示す。

キーワード：細胞画像処理, 物体追跡, 深層学習, 生体イメージング

1. はじめに

生体内の細胞は、生きている限り絶えず活動し続けており、そのような細胞の挙動を知ることは、生物学的・医学的にも重要な意味を持っている。例えば、皮膚を観察することで、顆粒球等の免疫細胞の動きが急性炎症やアレルギーといった条件によって変化する様子 [1] を、また、免疫細胞の一種であるマクロファージの動きが炎症刺激の条件によって変化する様子を観察することができる [2]。このように、生体内の免疫細胞は、疾患の進行度や薬の効能を示す数多くの情報を持っており、免疫細胞の挙動を解析することは、疾患の原因解明や新たな治療薬の開発等に貢献することが期待できる。

細胞の挙動を解析するにあたっては、近年、二光子励起顕微鏡を始めとしたバイオイメージング技術の発展により、生体内の細胞を傷つけることなく、生きたまま観察することができるようになった。それに伴い、微小な細胞の活動を鮮明に捉えるだけでなく、これまで捕捉できなかった時間軸を持った動的な情報を捉えることができるようになり、さらに踏み込んだ研究が行われるようになった。しかし一方で、日々大量に生産される動画から細胞の挙動を1つ1つ手作業で解析することは、肉体的にも、精神的にも大きな負担を要するという問題がある。また、人力での解析は、先入観による細胞の取り違えや、疲労による

誤った追跡等、観測者の主観によるバイアスにも影響を受けることが懸念されるため、計算機を利用した、自動的かつ客観的な解析手法の開発は喫急の課題となっている。

計算機を用いて細胞動態の解析を行うには、まず、個々の細胞を正確に追跡することにより解析に必要となる情報を抽出する必要がある。この手法として、従来は、コンピュータビジョンの分野で盛んに研究されている一般物体追跡のアルゴリズムを細胞追跡に応用することが広く行われている。具体的には、対象を領域分割と対応付けすることで追跡するトラッキング [3] や、特定の対象ではなく画像全体の動きから追跡を行うオプティカルフロー [4], [5], [6], そして、あらかじめ正解となるデータを学習した結果を基に追跡する機械学習など、様々な手法 [7] が提案されている。機械学習による追跡では追跡対象の物体が持つ一般的な特徴を学習することでノイズに頑強な追跡を行うことができるため、近年、目ざましい発展を遂げている。

しかし、トラッキングでは蛍光画像特有の強いノイズが原因となり、領域を認識するセグメンテーション [8] で、オプティカルフローではピクセル単位での追跡を行うという点で、追跡精度の問題が懸念されている。また、機械学習による物体追跡手法を細胞追跡に応用する場合、蛍光画像には色や形状の似た細胞が大量に存在する。細胞は、一般物体と異なり遊走と呼ばれる変形を伴った移動を行うという特徴があるため、それぞれの細胞を見目で区別することは非常に困難であり、学習に必要な正解ラベルのついた教師データを作成することが容易ではないという問題がある。

そこで本研究では、機械学習の中でも畳み込みニューラルネットワーク (Convolution Neural Network : CNN) を

¹ 大阪大学大学院情報科学研究科
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

² 大阪大学基礎工学部
School of Engineering Science, Osaka University

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

利用した細胞追跡手法に対して、データ拡張により教師データを増加させることで追跡精度の向上を試みる。さらに、本手法による追跡結果をもとに細胞動態の解析を行い、炎症刺激の違いに対する細胞動態の変化を比較することで、本手法が細胞動態の解析に効果的であることを示す。

2. 細胞追跡の先行研究

CNN を利用した一般物体追跡には、物体を1つずつトラッキングする Single-object 追跡 (SOT)[9], [10] と、複数の物体を同時にトラッキングする Multi-object 追跡 (MOT)[11], [12] が存在する。ここでは、細胞追跡の先行研究として、SOT 手法の1つである MDNet[13] と、MOT 手法の1つである Tracktor[14] について述べる。

2.1 細胞画像

二光子励起顕微鏡を用いて撮影された画像を、最大値投影法 (Maximum Intensity Projection : MIP) により二次元に投影した MIP 画像を利用する。二光子励起顕微鏡とは、励起光を当てる際に光子の密度を上げることで二光子吸収過程を引き起こし、励起状態を経て蛍光する様子を観察する顕微鏡であり、高い組織透過性と低い組織侵襲性により、生体内部の観察に適している [15]。また、最大値投影法とは、注目する対象の動きを認識しやすくするために三次元構造を二次元平面に投影する手法であり、投影によって Z 軸方向の情報は失われるものの、画像としては S/N 比が向上し、細胞の検出が行いやすいという利点がある。ここでは、最大値投影法も模式図とともに、細胞画像に適用した例を図 1 に示す。本研究にて実際に使用した細胞画像は、Z 軸方向スライスされた 15 枚の画像を MIP に よりに投影したものであるが、図 1 では、便宜上 3 枚を抽出したものである。

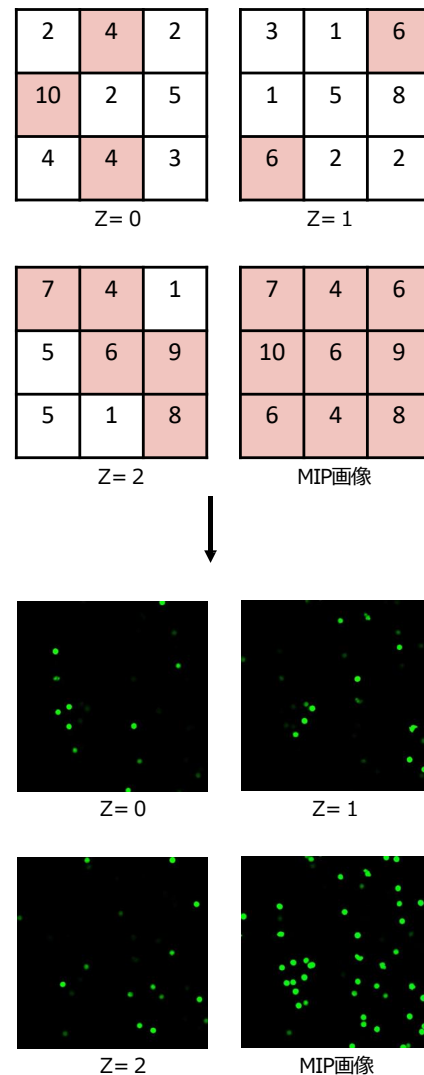


図 1 最大値投影法の適用例 (細胞画像)

2.2 MDNet

MDNet (Multi-Domain Net) は、機械学習による一般物体追跡手法のひとつであり、複数の物体を個々に追跡するアルゴリズム (SOT) に基づいて追跡を行っている [13]。

MDNet の特徴は、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) に基づき、対象となる物体の種類や背景に依存することなく、複数の対象を追跡できることである。ネットワークにマルチドメインの学習フレームワークを組み込むことで、追跡対象独自の特徴と、対象に依存しない共通の特徴とを分離し、共通の特徴のみを学習に利用する。そして、追跡対象に応じてネットワークを変更しながら追跡を繰り返すことで、追跡対象や背景に依存しない追跡を実現する。MDNet による追跡の流れを図 2 に示す。

このアルゴリズムを利用し、複数の追跡対象 25 種類の動画画像から構成される VOT2014 というコンテストデータセットを用いて追跡を行ったところ、コンテストで好成績

を残した手法と比較して、高い精度で追跡を行うことができることが示された [13]。

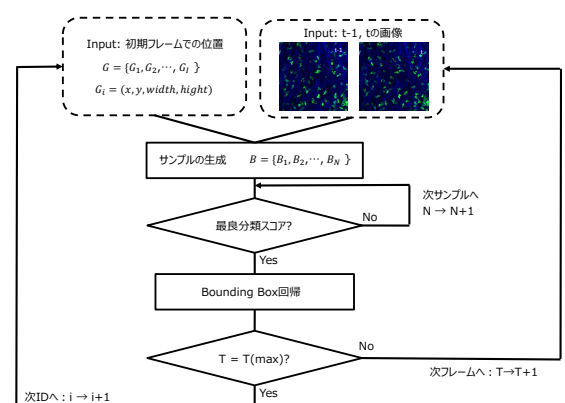


図 2 MDNet による追跡の流れ [13]

入力

MDNet で細胞追跡を行うときの入力は、二光子励起顕微鏡を用いて、細胞の動きを1分間置きに撮影した経時観察画像と、 $t = 0$ のフレーム (以下、初期フレームと呼ぶ) での各細胞の初期位置 (画像上での座標) である [16].

サンプル生成

時刻 t において、ある細胞 i の次フレームの位置を推定するために、まずは時刻 $t-1$ で細胞 i が観測された領域の位置周辺で、候補となる矩形をサンプリングすることにより探索する (B^1, B^2, \dots, B^N). これにより得られる矩形をサンプルと呼び、それぞれ矩形の左上 x 座標, 左上 y 座標, 幅, 高さで示す ($B^n = (x_{left}, y_{top}, width, height)$).

位置推定

対象の周囲に生成したサンプル (B^1, B^2, \dots, B^N) のうち、前景らしさを示すポジティブスコア f^+ と、背景らしさを示すネガティブスコア f^- を得る. この時、最も大きいポジティブスコアに対応するサンプル候補を、最適な次フレームでの位置として推定する. この時の計算式を、式 (1) に示す.

$$B^* = \arg \max_{B^i} f^+(B^i) \quad (1)$$

BoundingBox 回帰

対象の周囲に生成する複数のサンプルから位置推定を行うことにより、対象の位置を示す矩形が綺麗に対象を囲めない場合がある. そこで、物体検出の際によく用いられる BoundingBox 回帰を適用し、矩形の詳細な位置を推定する.

2.3 Tracktor

Tracktor は、機械学習による物体追跡手法の1つであり、複数の物体を同時に追跡するアルゴリズム (MOT) に基づいて追跡を行っている [14].

Tracktor の特徴は、物体検出器における分類器と回帰器を追跡に利用することで、複雑な追跡モデルを構築することなく追跡を行うことができることである. また、MDNet による物体追跡手法と比較し、物体検出器を利用するため追跡する対象の初期値を設定する必要がないことや、新たな物体の出現や物体の消失をも捉えることができる. そのため、細胞画像特有の、分裂や消滅といったような現象を捉えることができるというメリットがある. Tracktor による追跡の流れを図3に示す.

このアルゴリズムを利用し、複数の人物を捉えた画像から構成される MOT17 というデータセットを使用して追跡を行ったところ、高い精度で追跡を行うことができることが示された [14].

入力

Tracktor における入力は、二光子励起顕微鏡を用いて、

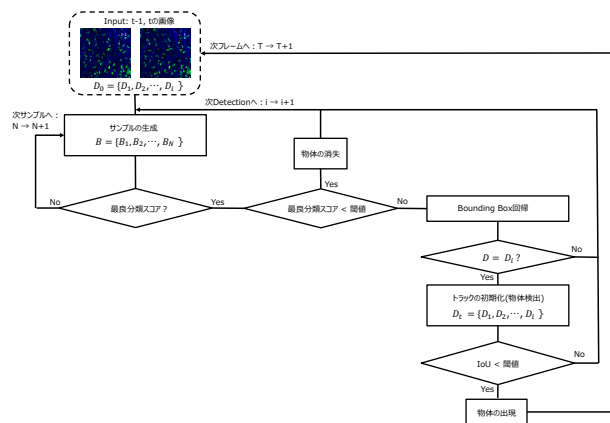


図3 Tracktor による追跡のフローチャート [14]

細胞の動きを1分間置きに撮影した経時観察画像である.

サンプル生成

2.2章と同様. ただし, Tracktor では, 初期フレームでの細胞位置を内包する物体検出器により検出する.

位置推定

2.2章と同様.

BoundingBox 回帰

2.2章と同様.

物体の出現と消失

追跡途中の物体消失と物体出現に対応するため, 式 (1) における分類スコアと, 式 (2) におけるオーバーラップ率を計算する. ここでは, 次フレームの位置として予測した領域の分類スコアが閾値以下の場合, 物体は消失したとみなす. また, 検出した物体において, 前フレームにおいて検出した全ての細胞とのオーバーラップ率が閾値以下である場合は, その物体を新しい物体として認識する. 2つの矩形におけるオーバーラップ率は, 次の式 (2) で示す. r_a は前フレームにおける矩形, r_b は検出した矩形を表す.

$$IoU = \frac{r_a \cap r_b}{r_a \cup r_b} \quad (2)$$

3. 細胞追跡の提案手法

3.1 概要

本研究では, 先行研究を利用した細胞追跡において高精度で追跡を行うことができた Tracktor を拡張する. 一般物体追跡を行う Tracktor を細胞追跡に応用するにあたり, 解析の対象となる細胞画像には, 似た色や形をした細胞が大量に存在している. そのため, このような画像から個々の細胞の動きを区別することは膨大な時間と多大な労力を要する. つまり, 細胞追跡には, 人力でのラベル付けが非常に困難であるために教師データが少ないと言った問題点があった. しかし, 深層学習において機械が高品質の学習, そして正確な予測を行うためには, 十分な量の教師データが必要不可欠である. そこで, 本手法では, データを拡張

することで、教師データを増加させながら学習を繰り返す手法を提案する。これにより、質の高い学習を行えるようになったことで、より精度の高い追跡が可能になる。細胞追跡の流れは、2.3章で示した手順に従う。

3.2 追跡の詳細

本手法では、物体の消失と物体の出現を判別する際、分類スコアと、オーバーラップ率を計算する。本手法においては、分類スコアが50%以上であり、前フレームとのオーバーラップ率が30%以上である場合のみ追跡を継続し、分類スコアが50%以上であり、かつオーバーラップ率が30%より少ない場合、その新たな物体として追跡する。そして、分類スコアが50%を下回った場合には、追跡を終了する。

3.3 データの前処理

本手法では、背景に依存しない細胞追跡を行うために、前処理として入力画像の各ピクセルにおける緑色のチャンネルのみを抽出する。これにより、物体と背景とが区別が容易になり、細胞が検出しやすくなる。

3.4 データ拡張

本手法では、不足する教師データを増加させるため、画像処理によるデータ拡張と、疑似ラベルによるデータ拡張を行った。

3.4.1 画像処理

画像処理によるデータ拡張とは、ラベル付けされた教師データを水増しする手法であり、一般的に、画像の回転、拡大/縮小、ノイズの付与などが挙げられる。本研究では、画像データを90°、180°、270°回転させたものを作成し、教師データを増加させた。

3.4.2 疑似ラベル

疑似ラベルによるデータ拡張とは、ラベル付けのされていないデータに対して、信頼度の高い予測を教師データとして学習に利用する手法である。本研究では、予測した追跡が、全フレームのうち80%以上において成功であると判断されたデータに疑似ラベルを付与することで、教師データを増加させながら学習を繰り返し行った。

4. 実験

4.1 細胞追跡の精度比較

4.1.1 実験データ

提案手法の学習と追跡の精度評価を行うために、複数の炎症刺激により炎症を誘導したマウスの皮膚を二光子励起顕微鏡によって撮影した画像を利用した。EGFP（緑色蛍光タンパク質）によって緑色に標識されているのが、免疫細胞の一種となる好中球（顆粒球）であり、本研究では、この細胞の追跡を行う。

表 1 2クラス分類の評価指標

		正解軌跡	
		Positive	Negative
予測軌跡	Positive	TP	FP
	Negative	FN	TN

4.1.2 評価指標

本手法では、このような2クラス分類の問題における性能評価によく利用される表1の指標をもとに、計8個の指標を用いて追跡精度を比較する。

- FP (False Positive)
全データに対して、誤って検出した回数（誤検出）。小さい値ほど良い結果であることを示す。
- FN (False Negative)
全データに対して、正解軌跡のうち、追跡できなかった回数（見逃し）。小さい値ほど良い結果であることを示す。
- Precision
予測軌跡のうち、正解軌跡の割合。大きい値ほど良い結果であることを示す。

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (3)$$

- Recall
正解軌跡のうち、正しく予測できた割合。大きい値ほど良い結果であることを示す。

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (4)$$

- IDSW (ID SWitch)
全データに対して、IDの割り当てが失敗した回数。小さい値ほど良い結果であることを示す。
- MT (Mostly-Tracked)
正解軌跡に対して、80%以上の追跡を行えた割合。大きい値ほど良い結果であることを示す。
- ML (Mostly-Lost)
正解予測に対して、20%以下の追跡しか行えなかった割合。小さい値ほど良い結果であることを示す。
- MOTA (Multi Object Tracking Accuracy) どのくらい正確に追跡できていたかの割合。大きい値ほど良い結果であることを示す。式(5)における g_t は、フレーム t における正解データの総和。

$$MOTA = \frac{FP + FN + IDSW}{g_t} \quad (5)$$

FP, FN, IDSW に関しては、全データセットにおける総和を、Precision, Recall, MT, ML に関しては、全データセットにおける平均値を比較する。

表 2 細胞追跡精度

	FP ↓	FN ↓	Precision ↑	Recall ↑
MDNet	9101	8661	0.670	0.682
Tracktor	2034	3959	0.937	0.884
提案手法	1069	4149	0.965	0.878
	IDSW ↓	MT ↑	ML ↓	MOTA ↑
MDNet	164	0.466	0.432	0.323
Tracktor	458	0.620	0.117	0.810
提案手法	414	0.657	0.091	0.834

表 3 解析データの詳細

炎症刺激	環境	追跡細胞数 (Tracktor)	追跡細胞数 (提案手法)
LPS	培養	120	132
GMCSF	培養	212	240
DNFB	生体内	167	180
PMA	生体内	175	191

4.1.3 追跡結果と考察

MDNet と Tracktor を用いて細胞追跡を行った結果と、提案手法により Tracktor を応用して細胞追跡を行った結果を、表 2 に示す。表 2 より、MDNet と比較して、Tracktor は IDSW 以外の指標において精度が高いことが示された。この IDSW における数値が高い原因としては、MDNet は初期フレームの画像中に現れている細胞のみ追跡を行うことができるのに対し、Tracktor は途中フレームで新たに出現した物体の追跡も行うため、検出する細胞数が非常に多いことに依存していると考えられる。

また、提案手法により Tracktor を改良し、細胞追跡を行った結果では、全 8 つ指標のうち 6 つの指標において精度が向上した。

4.2 細胞動態の解析

4.2.1 実験データ

炎症刺激の違いが引き起こす細胞動態の変化を比較するため、本研究では 4 種類の炎症刺激により炎症を誘導したマウスの皮膚を、二光子励起顕微鏡によって撮影した動画を解析に利用した。また、本研究では、全フレームのうち 80% 以上において追跡が行えた細胞のみ（表 2 における MT）を対象に解析を行った。解析に利用したデータセットの詳細は、表 3 に示す。

4.2.2 評価指標

本研究では、炎症刺激に対する細胞動態の変化を比較するために、各細胞の速度、曲率、そして大きさの 3 つの指標に基づいた解析を行う [17]。曲率の計算方法は、式 (6) に示す。

$$\kappa = \left(\frac{d^2y}{dt^2} \frac{dx}{dt} - \frac{d^2x}{dt^2} \frac{dy}{dt} \right) / \left(\frac{dx}{dt} + \frac{dy}{dt} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (6)$$

4.2.3 解析結果と考察

Tracktor、および提案手法により細胞追跡を行った結果

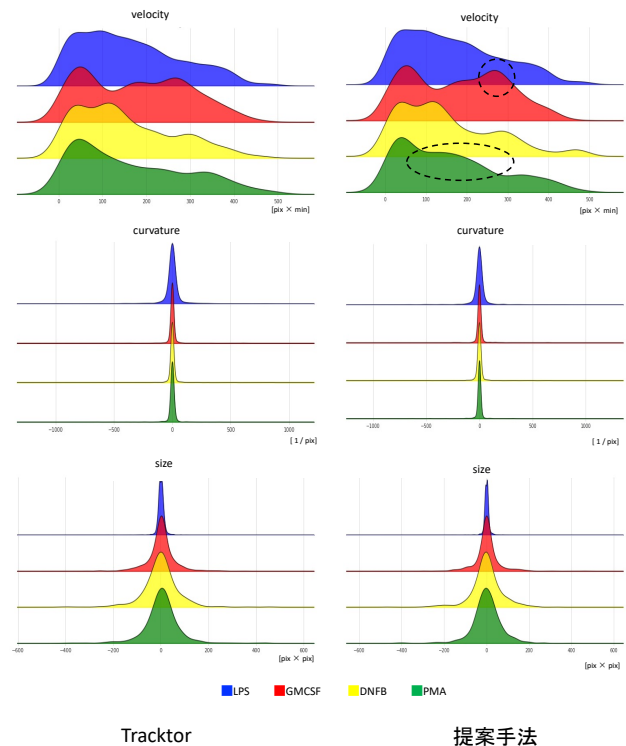


図 4 解析結果の比較

をもとに、炎症刺激に対する細胞動態の変化を示した図を、図 4 に示す。図 4 におけるこれら 6 つのグラフは、それぞれ 4 つの炎症刺激ごとに色分けをしており、特徴（速度、曲率、面積）を示す数値ごとに、観測された頻度を示したものである。ここでの色分けは、青色が LPS 刺激、赤色が GMCSF 刺激、黄色が DNFB 刺激、緑色 PMA 刺激を受けた細胞を示している。

図 4 より、提案手法により細胞追跡を行った結果をもとに細胞動態の解析を行ったところ、特に速度に関して、従来手法 (Tracktor) では特徴を捉えることができなかった特徴を動態解析に利用できることが分かる。また、それぞれ 4 つの炎症刺激の違いを比較したところ、炎症刺激が引き起こす細胞動態の違いをより明確に区別できることが示された。

5. おわりに

本研究では、一般物体追跡を行う Tracktor を拡張し、細胞追跡に特化した、深層学習による追跡手法を提案した。この手法により、特に細胞追跡において頻繁に問題視される教師データの不足を解決し、細胞画像においても精度が高い追跡を行うことが可能になった。また、本手法を用いることで、これまで捕捉できなかった特徴を持つ細胞を解析にできるようになり、より炎症刺激に対する細胞の動態解析に有用であることが示された。

しかし、提案手法による追跡は、不規則かつ活発な細胞

の動きを予測できていないこと,そして細胞画像におけるフレームレートが低いことが原因で,追跡途中の軌跡が途絶えてしまうことが多い.そこで今後の課題としては,投影の際に失われた深度情報を軌跡の消失の際に考慮することで,これまでよりも長期間にわたる軌跡の追跡が可能になるのではないかと考える.

参考文献

- [1] Kreisel, D., Nava, R. G., Li, W., Zinselmeyer, B. H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A. E., Krupnick, A. S. and Miller, M. J.: In vivo Two-Photon Imaging Reveals Monocyte-Dependent Neutrophil Extravasation during Pulmonary Inflammation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, Vol. 107, No. 42 (2010).
- [2] McArdle, S., Buscher, K., Ghosheh, Y., Pramod, A., Miller, J., Winkels, H., Wolf, D. and Ley, K.: Migratory and Dancing Macrophage Subsets in Atherosclerotic Lesions, *Circulation Research*, Vol. 125, No. 12, pp. 1038–1051 (online), DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315175> (2019).
- [3] Paul, V., Michael, K., Aljosa, O., Jonathon, L., Berin, B., Gnana, S., Andreas, G. and Bastian, L.: MOTS: Multi-Object Tracking and Segmentation, *The IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (2019).
- [4] Lucas, B. and Kanade, T.: An Iterative Image Registration Technique with an Application to Stereo Vision, *International Joint Conference on Artificial Intelligence*, Vol. 2, pp. 674–679 (1981).
- [5] Franeback, G.: Two-Frame Motion Estimation based on Polynomial Expansion, *In Scandinavian Conference on Image Analysis*, pp. 363–370 (2003).
- [6] Shigeta, H., Seno, S., Nishizawa, S., Uchida, Y., Kikuta, J., Ishii, M. and Matsuda, H.: Analyzing Leukocyte Migration Trajectories by Deformable Image Matching, *2019 IEEE 19th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*, pp. 94–98 (2019).
- [7] Neda, E., Zahra, S. and Reza, F.: Computerized Cell Tracking: Current Methods, Tools and Challenges, *Visual Informatics*, Vol. 5 (2021).
- [8] Carsen, S., Tim, W., Michalis, M. and Marius, P.: Cellpose: a Generalist Algorithm for Cellular Segmentation, *Nature Method* (2021).
- [9] Martin, D., Goutam, B., Fahad, S. and Michael, F.: ATOM: Accurate Tracking by Overlap Maximization, *The IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (2019).
- [10] Wang, Q., Zhang, L., Bertinetto, L., Hu, W. and Torr, P.: Fast Online Object Tracking and Segmentation: A Unifying Approach, *The IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (2019).
- [11] Nicolai, W., Alex, B. and Dietrich, P.: Simple Online and Realtime Tracking with a Deep Association Metric, *2017 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)* (2017).
- [12] Boukari, F. and Makrogiannis, S.: Automated Cell Tracking Using Motion Prediction-Based Matching and Event Handling, *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, Vol. 17 (2018).
- [13] Nam, H. and Han, B.: Learning Multi-Domain Convolutional Neural Networks for Visual Tracking, *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)* (2016).
- [14] Bergmann, P., Meinhard, T. and Leal-Taixe, L.: Tracking without Bells and Whistles, *The IEEE/CVF International Conference on Computer Vision (ICCV)*.
- [15] Ishii, M., Egen, J., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. and Germain, R.: Sphingosine-1-Phosphate Mobilizes Osteoclast Precursors and Regulates Bone Homeostasis, *Nature*, Vol. 458, No. 7237, pp. 524–528 (2009).
- [16] Fujimoto, K., Mizugaki, T., Rajkumar, U., Shigeta, H., Seno, S., Uchida, Y., Ishii, M., Bafna, V. and Matsuda, H.: A CNN-based Cell Tracking Method for Multi-slice Intravital Imaging Data, *Proceedings of the 12th ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics (BCB)*, pp. 1–7 (2021).
- [17] Heryanto, Y. D., Cheng, C.-Y., Uchida, Y., Mimura, K., Ishii, M. and Yamada, R.: Integrated Analysis of Cell Shape and Movement in Moving Frame, *Biology Open*, Vol. 10, No. 3, pp. 1–10 (2021).