

グラフカットを用いた骨髓腔画像の領域分割

宇佐見 潤^{1,a)} 繁田 浩功¹ 間下 以大^{1,2,b)} 黒田 嘉宏^{1,2} 菊田 順一^{3,4} 瀬尾 茂人¹ 石井 優^{3,4}
松田 秀雄^{1,5} 竹村 治雄^{1,2}

概要: 生体イメージング技術の向上により生体内の細胞の動態を動画像として観察が可能となり、疾病のメカニズム解明や創薬等への応用が期待されている。これらの応用のためには、細胞画像から特定領域を抽出したり、細胞の特定の動きを検出する必要がある。また、膨大な数の画像に対して一定の基準で領域分割や細胞の検出を行うためには計算機での処理が必要である。本論文では、二光子励起顕微鏡を用いた骨髓腔画像の骨髓腔の領域分割手法を提案する。本研究で対象とする生体細胞画像は生体の一部を時系列画像として撮影したものであり、骨髓腔領域と血流領域を分割するには、輝度値の高低や血流の有無等の情報を総合して判断される。提案手法ではこれらの情報をエネルギー関数に取り入れた上でグラフカットによる最適化を行い、領域分割を実現する。提案手法と従来のグラフカットとの比較評価を行った結果、hard-constraint というユーザの入力に依存した制約を用いていない提案手法が hard-constraint を用いている従来手法と同等以上の性能が得られることを確認した。

キーワード: 生体イメージング, グラフカット, 血流認識, 混合ガウス分布, 細胞画像処理

A Bone-Marrow Space Segmentation Method using Graph-Cuts

JUN USAMI^{1,a)} HIRONORI SHIGETA¹ TOMOHIRO MASHITA^{1,2,b)} YOSHIHIRO KURODA^{1,2}
JUNICHI KIKUTA^{3,4} SHIGETO SENOO¹ MASARU ISHII^{3,4} HIDEO MATSUDA^{1,5} HARUO TAKEMURA^{1,2}

Abstract: Emerging bio-imaging technologies are expected to contribute to the discovery of new drugs and the mechanisms by which diseases survive. In applications involving cell and bacterial imaging, extracting a particular region or detecting cell motion is essential. Moreover, automatic extraction and detection in image processing are also required because it is unrealistic to manually process a large number of images accurately, uniformly, and in a short period of time. To help automate this process, we introduce a bone-marrow space segmentation method for two-photon excitation microscopy images. Cellular dynamics specialists typically separate regions of bone-marrow and other spaces using several criteria such as blood flow characteristics and intensity. Taking these consideration, we designed data-term in graph-cuts method to process sequential images of the inside of a living mouse. Results of evaluations and comparison with normal graph-cuts show that our proposed method, which doesn't use hard constraints, achieves better performance than normal hard-constraint based graph-cuts methods.

Keywords: Bioimaging, Graph-cuts, Blood vessel recognition, Gaussian Mixture Model, Bioimage processing

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

³ 大阪大学大学院医学研究科
Graduate School of Medicine, Osaka University

⁴ 大阪大学大学院生命機能研究科

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

^{a)} usami.jun@lab.ime.cmc.osaka-u.ac.jp

^{b)} mashita@ime.cmc.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

生体イメージング技術の向上により、生体内の細胞の動態を映像として観察することが可能となり、疾病のメカニズムの解明、創薬等に重要な知見が得られると期待されている。なかでも二光子励起顕微鏡はさまざまな生体を「生きたまま」でより局所的で、より深い生体内の観測を可能にした。

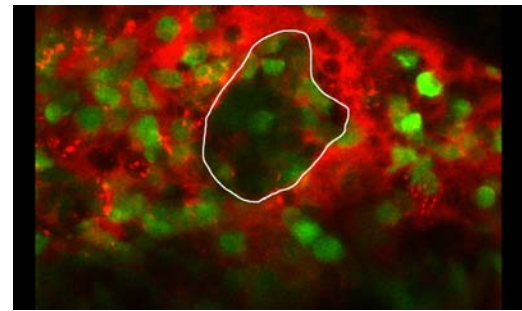
骨髓腔は硬い石灰質に囲まれた骨組織内部にあり、生きたままでの観察が困難であったが、二光子励起顕微鏡によって生体内の血管に血液が流れる様子や骨髓腔内の細胞の動態を映像として得られるようになった。Kikutaらはこのイメージング技術を用いて、破骨細胞が「骨の表面に存在するが骨の破壊をする破骨細胞(R型)」と「骨の表面に存在するが骨の破壊をしない破骨細胞(N型)」の発見に成功した[1]。このように、骨髓腔に出入りする細胞を発見・追跡することで、破骨細胞の挙動を解明し、骨粗しょう症等の骨を破壊するメカニズムの解明に繋がると期待される。

このような細胞の挙動をさらに解明するために、大量の映像から特定の領域や細胞の動態を自動的に検出する手法が求められている。特に、骨髓腔領域の検出は特定の細胞の検出に必要とされているが、骨髓腔の映像は複数の構造物が重なり合って写っているため、専門家による判断が必要であった。この問題に対し、本論文では専門家の判断基準を取り入れたグラフカットによる骨髓腔領域の分割手法を提案する。

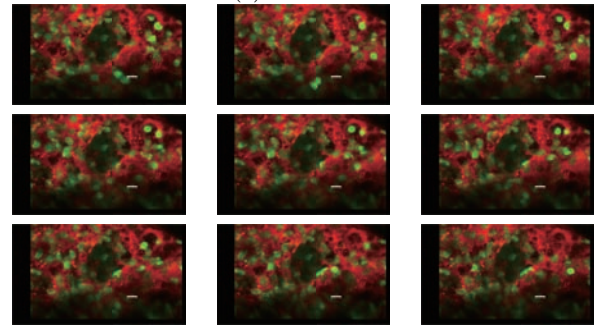
2. 関連研究

細胞画像における領域分割に関する研究として、Yinらは単純ベイズ分類器をもちたセグメンテーションを提案している[2]。Erikらの報告[3]によると、領域分割手法はさまざまな手法が試されているが、過去の領域分割手法に関しては閾値を用いたものが多く見られる。二光子励起顕微鏡で得られた生体画像解析の例として、Oliveieriらリンパ球に関する生体画像に対し、細胞のトラッキングを行う方法及びツールを提案している[4]。Yinらの研究[5]では、顕微鏡の特性のモデル化し、顕微鏡画像をさらに単純化している。これにより、位相差顕微鏡に関して、閾値だけでセグメンテーション可能な程度での画像の単純化に成功している。

2つの領域の境界線を連続に追跡する動的輪郭モデルとしてSnakes[6]やLevel Set Method[7], [8]と言われる方法が提案されている。これらはノイズに対して頑強な境界の追跡法として広く用いられている。Level Set Methodを応用した例として、蛍光顕微鏡で撮影された細胞群を追跡するDzyubachykらの手法が挙げられる[9]。Level Setは



(a) 骨髓腔領域



(b) 時系列画像の一例

図1 骨髓腔画像の一例(画像番号1)

適用可能範囲に制限があるため、蛍光顕微鏡画像でのセルトラッキングの場合に対して最適化を行った方法を提案している。他の応用例として、形状を利用して心臓の左室を認識し、Level Set Methodを拡張してトラッキングを行う方法も提案されている[10]。

領域分割の代表的な手法として、グラフカット[11], [12]が挙げられる。グラフカットの生体画像に対する応用例として、血管透過性の評価のために、時空間ボリュームに対して適用した例[13], [14]がある。また、形状に関する事前知識を利用する例として、成平らは肝臓領域のセグメンテーションに関して解剖学的形状特徴を取り入れ、事前入力自動化等の工夫を通して自動化や認識精度の向上を実現している[15]。

3. グラフカットを用いた骨髓腔領域分割手法

本研究で扱う骨髓腔画像の例を図1に示す。二光子励起顕微鏡では図1(b)に示す様な時系列画像として得られる。この画像では赤は血液であり、緑は細胞(好中球)である。また、図1(a)の白い線で囲まれた領域が骨髓腔である。骨髓腔領域とはこのような映像において、基本的には血液の存在しない領域である。対象画像は対象領域の位置や形状は変化しないことや、境界が曖昧な場合もあることから、グラフカットによる領域抽出手法が適していると考えられる。

対象とする細胞画像では、細胞や血管を流れる血液、時間の経過による血液の染み込みのような性質や、他にも、顕微鏡による見えにくい部分が発生する。そのため、Boykovらのグラフカットを用いたセグメンテーション[11]の輝度

値のみから決定されるデータ項では、正確なセグメンテーションは困難と考えられる。そのため、専門家の判断基準をグラフカットのデータ項に取り入れる。

また、Boykov らの手法では、シードと呼ばれるユーザの入力を用いているがエネルギー計算でシードの画素には *hard-constraints* と呼ばれる、一番高いエネルギーが設定される。領域分割の場合このシードの位置が分割の結果に強く影響する。本研究で対象とするような、大量の画像に対する均一な処理が求められる場合には、全ての画像に正しくシードを与えることは現実的でなく、このような手法は不向きと言える。このことから、一度のパラメータ設定で大量の画像に対する均一な処理を行うため、提案手法は *hard-constraints* のようなユーザの入力した画素の位置に依存した制約を設けない。

3.1 グラフカット

グラフカットは、様々な問題をエネルギーの最小化という枠組みで捉える手法である [16]。画素等を表すサイトの集合に対して、それぞれのサイトにラベルを割り振る問題に置き換える。サイトへのラベルの配置に対してエネルギー関数を定義し、その最小化問題に置き換えて解を得る。

一般に、サイトの有限集合を V とする場合、ラベル L の配置 $X: V \rightarrow L$ に対するエネルギー関数 $E(X)$ は次の式で表される。

$$E(X) = \sum_{v \in V} g_v(X_v) + \sum_{(u,v) \in E} h_{uv}(X_u, X_v) \quad (1)$$

ここで、 $E \subset V \times V$ はサイト間の隣接を表し、 $(u, v) \in E$ において u, v は隣接している。この時、配置 X に対してサイトの因子のみで決まる g_v を含む第一項は一般にデータ項、またサイト間で X に与えられるラベルの関係により定義される h_{uv} を含む第二項は平滑化項と呼ばれる。サイトの集合やラベルの集合、さらにデータ項や平滑化項を表す関数 g, h は問題に応じて柔軟に定義できるため、幅広い応用が可能である。具体的には、問題に対応するグラフを定義し、データ項や平滑化項に対応する辺の重みを持たせる。このグラフの最小切断問題に置き換えて解くことが可能であり、双対にあたる最大流問題を解くアルゴリズムなどを用いて最適解を得る。

3.2 エネルギー関数

二光子励起顕微鏡の画像では前後に存在する血液等も重なって撮影されるため、図 1 にもあるように、骨髓腔内においても赤い領域が存在する。このような映像に対し、専門家は、

判断基準 1 血液の流れていない部分 (図 1 中央の暗い部分) でおおまかな骨髓腔の領域を判断する

判断基準 2 血液の色 (図 1 の赤い領域) を利用して血管

の領域を判断する

判断基準 3 骨髓腔と血管の境界線が不明確な場合は、時系列画像内で血液の流れで骨髓腔と血管の境界を判断する

等の判断基準によって骨髓腔領域を認識している。本研究ではグラフカットのデータ項に上記の判断基準を参考にしたエネルギー関数を設定することで骨髓腔領域の分割手法を実現する。

判断基準 1 と判断基準 2 については基本的には血液の輝度を用いて判断されているため、輝度値の利用が有効と考えられる。また、血液の輝度は一様でなく、染色されていない細胞などを含んでいるため、空間的に細かく変化している。輝度値だけではこのような変化の影響を受けるため、空間的な輝度の変化も考慮する必要がある。判断基準 3 については、血流を用いているということは血流による時間的な輝度の変化を用いていると考えられる。すなわち、時間的な輝度の変化も考慮すべきである。以上から、エネルギー関数には、輝度値、空間方向の輝度の変化、時間方向の輝度の変化を用いる。具体的には、それぞれ、輝度、ラプリアンフィルタ、フレーム間差分の値を用いる。それぞれの値を用いた尤度を $\text{Pr}_R(I_p|\theta_I)$, $\text{Pr}_F(F_p|\theta_F)$, $\text{Pr}_B(B_p|\theta_B)$ とし、各尤度について重み係数 λ_R と λ_F , λ_B を用いて、エネルギー関数のデータ項を

$$g_v(X_v) = \lambda_R \cdot \text{Pr}_R(I(X_v)|\theta_I) + \lambda_F \cdot \text{Pr}_F(F(X_v)|\theta_F) + \lambda_B \cdot \text{Pr}_B(B(X_v)|\theta_B) \quad (2)$$

とする。ここで、 X_v は画像中の座標、 θ_I , θ_F , θ_B は各尤度関数のパラメータであり、各尤度関数は混合正規分布で表されるものとする。また、骨髓腔ではない背景領域についても同様のエネルギー関数を用いる。

4. 評価実験

提案手法を骨髓腔画像の領域分割の精度評価と、グラフカットを用いた従来法との比較評価の 2 つの評価実験を行った。実装には、MathWorks 社の MATLAB R2013b 及び Image Processing Toolbox, Statistics Toolbox を用いて行った。最大流量を求める処理には、Boykov らの C 言語の実装である maxflow 3.01 [20] を用いた。対象としている生体画像は、二光子励起顕微鏡で生きたままの生体を観測しているため、脈拍等によって位置ずれが発生する。本研究では、画像処理支援環境 ImageJ[17] のプラグインとして実装されている Turboreg[18] と Stackreg[19] を用いて画像の位置合わせを行った。 F_p に用いられているラプリアンフィルタは、そのカーネルサイズを 5×5 、標準偏差を 0.5 とした。各エネルギー関数のパラメータ推定にはマウスストロークによってシードと呼ばれるサンプルを決定しその画素の値を用いた。推定には EM アルゴリズムを

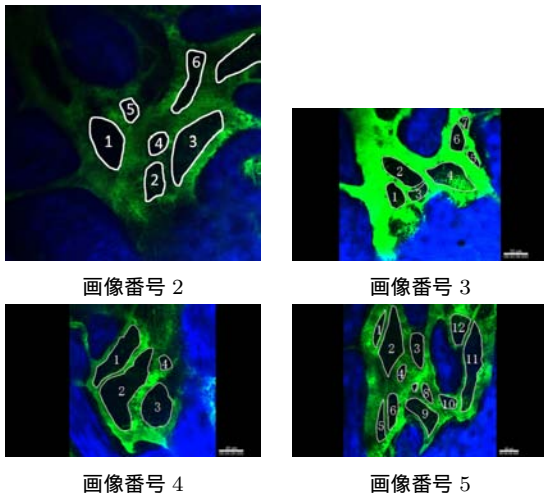


図 2 評価実験に用いた骨髓腔画像

用い、混合数は 2 とした。

図 2 に対象画像の一例を示す。この図では緑が血液であり、青い領域は骨である。図中の白い線で囲まれた領域は専門家の手によって得られた骨髓腔領域である。この図のように、画像中には複数の骨髓腔領域が存在し、各領域には図中の番号のラベルが付けられている。本実験では、それぞれの骨髓腔領域に対してストロークによるシード入力を行い評価を行った。

4.1 抽出精度

図 1 の画像に対して本手法を用いて骨髓腔の抽出を行った結果を図 3 に示す。それぞれのパラメータは図中に示す通りである。ここで、 c はエネルギー関数における平滑化項の重みであり、 σ は隣接画素間の輝度差をどの程度許容するかを決定する。図 1 の抽出結果の適合率と再現率を表 1 に示す。この結果から骨髓腔領域の分割は、図 3 (c) のように、血流の重みをもっとも大きくし、輝度値やラプラスアンフィルタ、そして平滑化項の調整することで精度が得られることが分かる。すなわち、骨髓腔領域の抽出には時間的な変化が重要であり、提案手法はデータ項にこれを加えることで骨髓腔領域の抽出精度が向上していると言える。

4.2 既存手法との比較

Boykov らの手法 [11] と比較実験を行った。3 節で述べた様に、hard-constraints のように入力されたシードの位置が抽出結果に強い影響を与えることは大量の画像を処理するには好ましくない。そこで、本実験では、Boykov ら

表 1 図 3 の適合率と再現率

	再現率 [%]	適合率 [%]
図 3 (a)	83.7	96.2
図 3 (b)	81.9	96.9
図 3 (c)	85.6	97.2



$$\sigma = 10, c = 100, \lambda_R = 10$$

図 4 図 1 の画像に Boykov らのグラフカット (比較手法 1) を用いた結果



$$\sigma = 10, c = 100, \lambda_R = 10$$

図 5 図 1 の画像に Boykov らのグラフカット (比較手法 2) を用いた結果

の手法でシードの位置による制約がある場合 (比較手法 1) およびシードの位置による制約がない場合 (比較手法 2) と比較する。提案手法とこれらの既存手法には同じストロークによるシードの入力を行う。図 1 の骨髓腔画像に対して骨髓腔を抽出した結果を図 4、図 5 に示す。これらの結果から、Boykov らの手法では骨髓腔領域が他の領域と繋がってしまい、抽出することはできなかったが、本研究の提案手法では抽出できていることが分かる。

提案手法と Boykov らの手法を比べると、Boykov らの手法では右上の領域を抽出できておらず、左下で、他の領域と繋がっていることがわかる。このことから、血液の動きをデータ項に加えた結果、画素値だけでは認識が困難な部分を抽出可能になったと考えられる。

図 1 と図 2 の合計 5 つの時系列骨髓腔画像に対して実験を行った。骨髓腔の数は合計で 30 である。他の骨髓腔領域と繋がらずに抽出できた場合に抽出に成功したとし、骨髓腔の抽出に成功した数を表 2 に示す。提案手法が 80.0% の骨髓腔領域の抽出に成功し、比較手法 1 では 70.0%、比較手法 2 では 53.3% であった。提案手法でのみ分割に成功した骨髓腔における評価を表 3 に示す。これら結果から、提案手法は比較手法に対して安定して骨髓腔領域を抽出できていると言える。表 3 の対象画像の列は (画像番号)-(骨髓

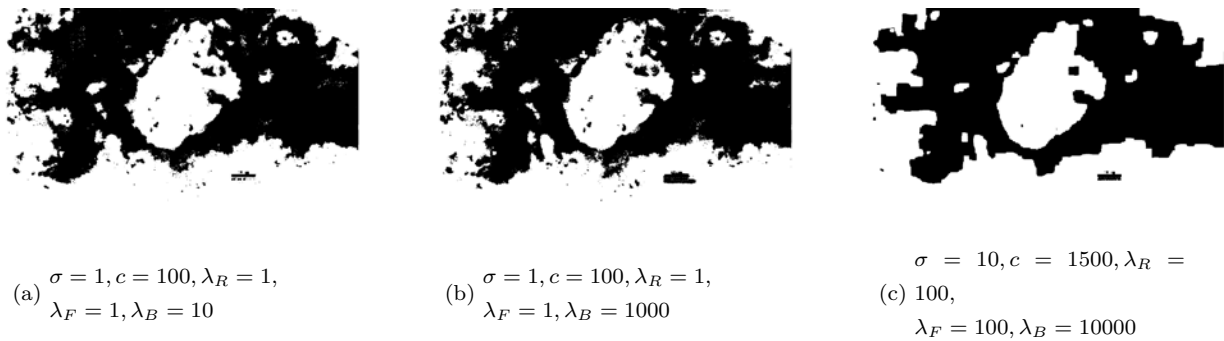


図 3 骨髓腔領域の抽出結果

腔領域のラベル番号) である。この結果から他手法では抽出できない場合でも抽出精度は変わらないことがわかった。

成功した領域分割の再現率と適合率の平均を表 4 に示す。これらの結果から成功した領域分割の再現率の平均は全体的に大きな差は見られなかった。適合率は全ての手法で高かったが、その中では提案手法が最も低かった。

領域抽出の再現率が 80% を越えている対象画像の数について表 5 に示す。提案手法は再現率 80% 以上の領域分割に 14 例成功しており、比較手法 1 では 13 例、比較手法 2 では 8 例であった。分割に成功する割合は提案手法が高く、再現率 80% の領域分割は Boykov らの手法と大きな差は見られなかったが、hard-constraint を用いない比較手法 2 は大きく劣る結果となった。このことから、提案手法は hard-constraint を用いずに用いている手法と同程度以上の性能を実現していることが分かる。

表 2 骨髓腔領域の分割に成功した数
抽出率 [%]

	抽出率 [%]
提案手法	80.0
比較手法 1	70.0
比較手法 2	53.3

表 3 提案手法のみで分割に成功した骨髓腔領域の評価

対象画像	再現率	適合率
1	85.6	97.1
3-1	96.6	96.6
3-3	96.5	73.3
3-5	80.4	98.6
5-12	72.7	98.6
平均	85.8	91.2

表 4 成功した領域分割の再現率の平均

	比較手法 1	比較手法 2	提案手法
平均再現率	80.0	79.1	78.6
平均適合率	97.9	98.4	95.7

表 5 再現率 80% で抽出した骨髓腔領域の数

	比較手法 1	比較手法 2	提案手法
抽出数	13	8	14

提案手法で抽出に成功し、比較手法で抽出に失敗した例を図 6 に示す。図 6 で赤で囲っている部分が提案手法で抽出に成功し、比較手法で失敗している箇所である。比較手法 1, 2 では骨髓腔領域が他の領域と繋がっていることがわかる。この画像ではこの繋がっている部分の輝度値は比較的低く、輝度値だけでは骨髓腔と判断するのは難しいが、血流による輝度の変化があるため、提案手法では抽出に成功していると思われる。

図 7 に本手法で抽出に失敗した例を示す。図 7 (a) が骨髓腔領域の抽出結果であり、(b) が対象の画像列である。図 7 の真値は図 2 の画像番号 5 のラベル付けされた領域であるが、図 7 の各所で抽出した骨髓腔領域が他の骨髓腔領域と繋がっていることがわかる。また、画像列から、細かい隙間を血液が流れていて比較的血流の時間的な動きが少ないことがわかる。このような輝度値での判断が困難で血液の僅かな動きの画像に対しては、提案手法では抽出に失敗することがわかった。

5. おわりに

本論文では、二光子励起顕微鏡を用いて得られた骨髓腔の生体画像を対象画像とし、対象とする生体画像の性質を考慮してグラフカットのエネルギー関数を設計し、血流領域と骨髓腔領域の分割手法を提案した。評価実験を行い、提案手法は一般的に用いられる Boykov らのグラフカットよりも安定して骨髓腔領域を抽出できることを示した。また、提案手法はユーザのクリックやストロークで入力されたシードの位置による制約を用いずとも Boykov らのグラフカット以上に安定して骨髓腔領域の抽出ができるため、大量の画像を処理にする場合に適しているといえる。一方、提案手法はデータ項に複数の画像処理の結果を用いているため、それぞれの重みを決めるパラメータの調整が必要である。今後の課題として、これらのパラメータを自動的に決定する手法の開発等があげられる。

参考文献

- [1] Kikuta, J., et al. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function, The Journal of clinical investigation vol. 123, no. 2, pp. 866-873, (2013).

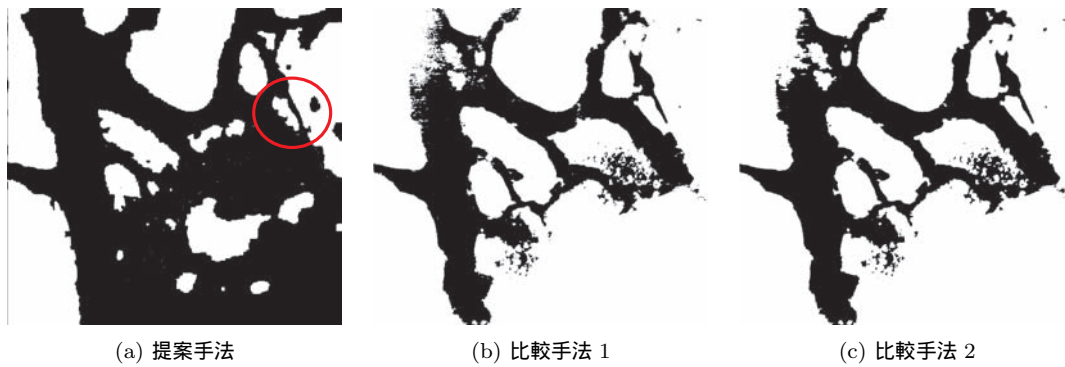
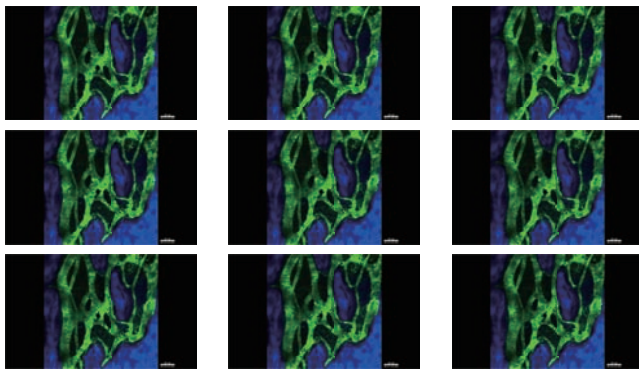


図 6 提案手法で成功した抽出例



(a) 抽出した骨髓腔領域



(b) 時系列画像の一例

図 7 骨髓腔領域の抽出に失敗した例

- [2] Yin, Z., Ryoma, B., Mei, C., Kanade, T.: Cell Segmentation in Microscopy Imagery Using a Bag of Local Bayesian Classifiers, The IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, pp. 125-128, (2010).
- [3] Erik Meijering.: Cell Segmentation: 50 Years Down the Road, IEEE Signal Processing Magazine, Vol. 29, No. 5, pp. 140-145, (2012).
- [4] Olivieri, D., Faro, J., Gomez-Conde, I., and Tadokoro, C. E.: Tracking T and B cells from two-photon microscopy imaging using constrained SMC clusters, Journal of integrative bioinformatics, Vol. 8, No. 3, 180, (2011).
- [5] Yin, Z., Li, K., Kanade, T., and Chen, M.: Understanding the optics to aid microscopy image segmentation, International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, pp. 209-217, (2010).
- [6] Kass, M., Witkin, A., and Terzopoulos, D.: Snakes, Active contour models, International Journal of Computer Vision, Vol. 1, No. 4, pp. 321-331, (1988).
- [7] Osher, S. and Sethian, J. A.: Fronts propagating with curvature dependent speed: Algorithm based on Hamilton-Javobi formation, Journal of Computational Physics, Vol. 79, pp. 12-49, (1988).
- [8] Sethian, J. A.: Level Set Methods: Evolving Interfaces in Geometry, Fluid Mechanics, Computer Vision and Materials Sciences, Cambridge University Press, (1996).
- [9] Dzyubachyk, O., Van Cappellen, W. A., Essers, J., Niessen, W. J., and Meijering, E.: Advanced level-set-based cell tracking in time-lapse fluorescence microscopy, IEEE transactions on medical imaging, Vol. 29, No. 3, pp. 852-867, (2010).
- [10] Paragios, N.: A level set approach for shape-driven segmentation and tracking of the left ventricle, IEEE transactions on medical imaging, Vol. 22, No. 6, pp.773-776, (2003).
- [11] Boykov, Y. and Jolly, M. P.: Interactive Graph Cuts for Optimal Boundary & Region Segmentation of Objects in N-D Images, International Conference on Computer Vision, Vol. I, pp. 105-112, (2001).
- [12] Boykov, Y. and Funka-Lea, G.: Graph cuts and efficient n-d image segmentation, International Journal of Computer Vision, Vol. 70, No. 2, pp. 109-131, (2006).
- [13] 繁田 浩功, 間下 以大, 金子 雄, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 竹村 治雄, 松田 秀雄, 石井 優: グラフカットを用いた生体骨組織における血管透過性の評価手法, 情報処理学会研究報告 (SIG-BIO), (2013).
- [14] 繁田 浩功, 間下 以大, 金子 雄, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 竹村 治雄, 松田 秀雄, 石井 優: 時空間ボリュームを用いた生体骨組織における血管透過性の評価手法, 画像の認識と理解シンポジウム MIRU2013, SS13-1, (2013).
- [15] 成平 拓也, 清水 昭伸, 小畑 秀文, 縄野 繁, 篠崎 賢治: 単純と造影 CT 像からの転移性肝腫瘍セグメンテーション処理, 電子情報通信学会技術研究報告 MI 109(127), pp. 79-84, (2009).
- [16] 倉爪 亮, 石川 博, 加藤 丈和, 佐藤 淳, 三田 雄志: CVIM チュートリアルシリーズコンピュータビジョン最先端ガイド 1, アドコムメディア株式会社, (2008).
- [17] Collins, T. J.: ImageJ for microscopy., Biotechniques, Vol. 43, No. 1 Suppl, pp. 25-30 (2007).
- [18] Biomedical Imaging Group: TurboReg, <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/turboreg/>, 最終アクセス 2014 年 2 月 3 日.
- [19] Biomedical Imaging Group: StackReg, <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>, 最終アクセス 2014 年 2 月 3 日.
- [20] Boykov, Y. and Kolmogorov, V.: maxflow, <http://pub.ist.ac.at/~vnk/software.html>, Last access(Feb 24, 2013)