Vol.2016-MPS-107 No.10
2016/3/8

Deep learningを用いた脂肪組織画像における細胞の認識

水野 雄太[1]　瀬尾 茂人[2]　渡邊 誓旅[2]　竹中 要一[2]　平松 拓郎[3]　後藤 剛[3,4]　河田 照雄[3,4]
松田 秀雄[2,a)]

概要：内臓脂肪の過剰蓄積は，糖尿病や高脂血症，動脈硬化症などの生活習慣病発症の主要因となるため，肥満研究において脂肪組織の特徴を解析することは重要な課題である．肥満に関する脂肪組織の特徴として最も端的な事柄は，脂肪細胞の肥大化であり，そのため細胞の大きさと数を計測する必要がある．この計測には様々な方法が用いられるが，脂肪細胞切片を染色し撮影した画像から情報処理技術を用いて手動・自動で計数を行うのも一般的な方法である．しかしながら，手動で計測するには細胞数が多いため労力がかかり，また従来行われてきた自動的な処理では撮影環境の違いやノイズによる精度の低下が問題とされている．そこで本研究では，近年発展の目覚ましい機械学習の技法のひとつである Deep Convolutional Network に注目し，脂肪細胞画像から細胞領域の認識を行うために利用した．

キーワード：バイオイメージインフォマティクス，脂肪細胞，セグメンテーション，ディープラーニング，画素単位畳み込みニューラルネットワーク

Recognition of the cells in adipose tissue image using Deep learning

Yuta Mizuno[1]　Shigeto Seno[2]　Seiryo Watanabe[2]　Yoichi Takenaka[2]　Takuro Hiramatsu[3]
Tsuyoshi Goto[3,4]　Teruo Kawada[3,4]　Hideo Matsuda[2,a)]

Abstract: It is important problem to analyze the characteristics of adipose tissue in an obese study, because the excessive accumulation of the internal organs lipid causes the lifestyle-related disease onset such as diabetes and hyperlipidemia, the arteriosclerosis. The most straightforward matter of adipose tissue about obesity is enlargement of the adipocytes, therefore it is necessary to measure size and quantity of adipocytes. Various methods are used for this measurement, and one of the typical method is to exploit information processing technology. However, manual methods take labor because of amount of cells, and automated processings which has been used conventionally is considered the drop of the accuracy, which caused by a differences of the photography environments, or noises included in the images. Therefore, in this study, we payed attention to Deep Convolutional Network which is one of the most remarkable technologies of the machine learning in late years, and used it for automated recognition of adipocytes areas in images of adipose tissue.

Keywords: Bioimaging Informatics, Adipocytes, Segmentation, Deep Learning, Pixelwise Convolutional Neural Network

1. はじめに

近年のバイオイメージング技術の向上と普及は, 本来肉

1 大阪大学基礎工学部情報科学科
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 and Technology, Osaka University
3 京都大学大学院農学研究科
Graduate School of Agriculture, Kyoto University
4 京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学ユニット
Research Unit for Physiological Chemistry, C-PIER, Kyoto University
a) matsuda@ist.osaka-u.ac.jp

ⓒ 2016 Information Processing Society of Japan

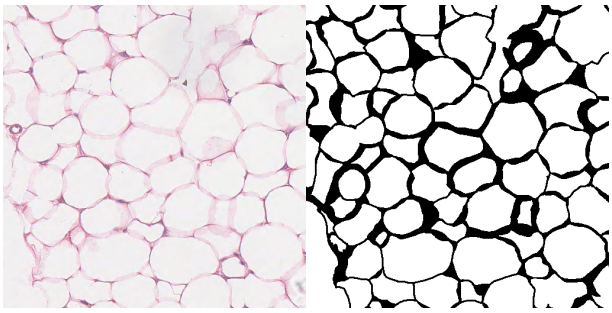

図 1 左図:元の脂肪組織画像. 右図:領域認識結果の二値画像.
Fig. 1 Left image: Original adipose tissue image. Right image: Resulting binary image.

眼での確認が困難である様々な生体の画像観察を可能にした．バイオイメージング技術を用いて得られた生体画像については，単にそれを見て観察するだけでなく，定量化によって性質を数値として計測する事への要求がある．このような定量化はこれまで人間の目視によって行われてきたが，この方法では計測に観察者のバイアスが介在する，また人間の手に負えない程の膨大な生体画像の解析が必要とされる場合がある等の理由から，必ずしも客観的な信頼に足るデータを得ることはできなかった．そこで，自動的で精密かつ再現性を持つ，ハイスループットな生体画像定量化を目的として，画像解析や情報学の技術を利用するバイオイメージインフォマティクスのニーズが生まれた [1,2].

バイオイメージインフォマティクスの分野では，細胞の画像を撮影して定量化を行う技術も関心を持たれている．例えば，脂肪組織内の脂肪細胞の量と大きさはその生理機能を反映するものとされ，特に内臓脂肪の増加や肥大化は，肥満や二型糖尿病，動脈硬化等の代謝性疾患との結びつきが非常に強いことが確認されている．このことから，脂肪組織画像に含まれる脂肪細胞の領域認識及び面積の測定は，科学的，臨床的に重要であるが，脂肪細胞の領域認識は大規模な調査となるため，手動では非常に困難かつ手間がかかるタスクである [3,4].

脂肪組織画像の定量化は，一般的に脂肪組織画像を入力として，細胞部を白，背景部を黒とした二値画像を出力し，各細胞部の面積を計測することで行われる（**図 1**）．このような画像に基づく領域の定量化をセグメンテーションと呼ぶ．セグメンテーションの手法として二値化やエッジ検出等の画像処理技術が用いられてきた．

本研究では，多様な環境で撮影された脂肪組織画像へのセグメンテーションを目的として，ディープラーニングによる教師付き学習によって，図 1 に示されるような教師付きデータを元に精度を向上させる手法を検討した。今回はディープラーニングの中でも画像認識に適した多層ニューラルネットである畳み込みニューラルネットワークを採用し，用意した訓練用の教師付き脂肪組織画像での訓練後，これをテスト用画像に適用して調査を行った．

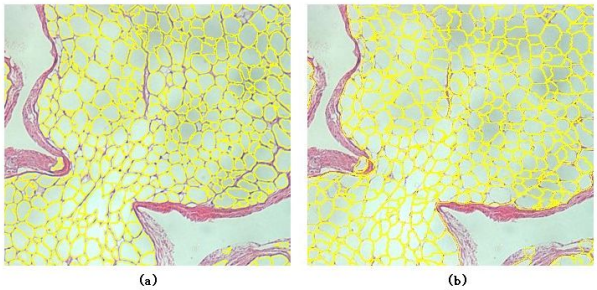

図 2 (a): Simple segmentation 法による認識結果．(b): Watershed segmentation 法による認識結果.
Fig. 2 (a): Resulting segmentation by Simple segmentation method. (b): Resulting segmentation by Watershed segmentation method.

2. 関連研究

2.1 脂肪細胞の画像処理ソフトウェア

脂肪組織画像における細胞セグメンテーションのためのツールとして，バイオイメージインフォマティクスのためのソフトウェア ImageJ 用のツール Adipocytes Tools [5] が提供されている．

Adipocytes Tools では Simple Segmentation と Watershed Segmentation の二つの手法が提供されている．これらの手法の大まかなアルゴリズムを以下に説明すると共に，各手法のセグメンテーション結果の例を**図 2** に示す．黄色い枠に囲まれた部分が脂肪細胞として認識された細胞領域を示す．

- Simple segmentation 法
  (1) clear background（背景除去）処理.
  (2) Sobel フィルタによるエッジ検出.
  (3) 8-bit グレースケール画像への変換.
  (4) 3*3 の移動平均フィルタによる平滑化.
  (5) 任意の閾値による二値化.
  (6) Watershed（分水嶺）法による領域分割.
- Watershed segmentation 法
  (1) clear background（背景除去）処理.
  (2) Sobel フィルタによるエッジ検出.
  (3) 8-bit グレースケール画像への変換.
  (4) ガウシアンフィルタによる平滑化.
  (5) Watershed Algorithm [6] の実行.

2.2 問題点

Adipocytes Tools は幾つかの問題点を抱えている．ここでは，特に大きな二つの問題点について述べる．

2.2.1 脂肪組織画像の多様性

脂肪組織画像をはじめとした生体画像解析の困難さの主な原因の一つは，生体画像自体が様々な条件下で撮影されているということである．これまでに紹介してきた脂肪組

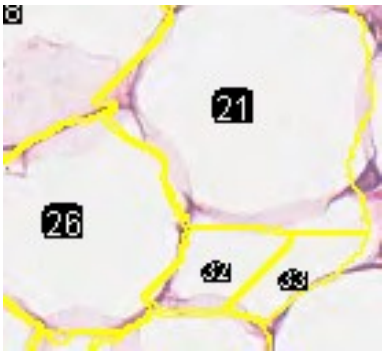

図 3 図 1 の元画像に Watershed 法を適用した結果.
Fig. 3 Resulting section of original image of Fig.1 by Watershed method.

織画像，図 1, 図 2 を見ただけでも，縮尺の違いによる画素単位での脂肪細胞のサイズ，細胞領域の輝度，ノイズの入り方等に違いがあることが分かる．

このように多様な性質を持つ画像を画像処理用ソフトウェアを用いて解析するためには，個別対処的なパラメータ設定が不可欠となる．例えば Adipocytes Tools による細胞認識では，二値化の手法や，脂肪細胞のサイズの下限と上限等のパラメータを予め設定しておく必要がある．このようなパラメータは最終的には人間が画像を観察して設定する必要があり，各人のバイアスを切り離した客観的な定量化は困難となる．

2.2.2 Watershed 法の問題点

Adipocytes Tools で実装されている二つのセグメンテーション手法は，共に Watershed（分水嶺）法を採用している．Watershed 法は，画像の輝度勾配における最小値部分を分割する領域分割の手法である．脂肪細胞のセグメンテーションにおいては，二値化の段階で繋がってしまっている細胞に対して輝度距離を取り，その輝度勾配に基いて細胞を切り離す．

この手法は，各脂肪細胞が円形や楕円形に近い形状であると想定した場合に良い結果をもたらすが，実際にはそのような形状を持たない細胞も存在する．特に縮尺の大きい脂肪組織画像内には不規則な形状の細胞が多く含まれ，細胞を過剰に分割してしまうことが確認される．**図 3** はその具体例であり，本来 32 と 33 の領域は一つの脂肪細胞だが，Watershed 法によって過剰に分割されている．

3. 畳み込みニューラルネットワークを用いた細胞セグメンテーション

2.2 章で記したように，ImageJ のようなソフトウェアを用いた細胞認識は画像の多様性のために各種パラメータ設定が難しく，場合によっては手法そのものが適合しない場合も想定される．

そこで，本稿ではこのような問題を教師付き学習によって解決することを提案する．教室付き学習を用いることで，蓄積された脂肪組織画像とそのセグメンテーションの教師データのセット (例，図 1) さえあれば，それを訓練用データとして用いることで，個別で専門的な技量を必要とすることなくセグメンテーションの精度を高めることができる環境の実装を検討した．その具体的な手法として，教師付き学習の手法として近年高い性能が認知され注目を浴びている [7]Deep Learning（深層学習）に着目し，中でも画像認識に広く利用されている畳み込みニューラルネットワーク (以下 CNN) を用いた細胞セグメンテーションを行った．

3.1 画素単位 (Pixelwise) 畳み込みニューラルネットワーク

CNN は，主に画像分類に用いられる多層ニューラルネットの一種である．入力として与えられるのは一枚の画像ファイルであり，CNN はその画像が分類される単一のラベルを決定する．一方，脂肪細胞のセグメンテーションは画像内の各画素に対し図 1 の右図のように細胞 (白) と背景部分 (黒) の二種類の分類ラベルを与えるものと考えることができる．

このように，画像に含まれる画素を入力の単位として扱いラベルを与える分類方法を Pixelwise Classification と呼び，特に生医学の視覚的解析に分野での関心を集めている．

Pixelwise Classification を行う CNN モデルは既に幾つか開発されており，今回はその中でも ISBI Cell Tracking Challenge 2015 での顕微鏡検査画像の細胞セグメンテーションにおいて，好成績で優勝を果たした U-Net [8] を用いた．

3.2 U-Net

U-Net は**図 4** のネットワーク構造を持つ CNN モデルである．図 4 において，矢印はレイヤーの処理内容を示し，縦棒は各段階での特徴マップを示す．各特徴マップの上の数字は特徴マップの数，左端の数字は特徴マップの解像度を示す．U-Net は構造的特徴として収束経路 (contracting path) と拡散経路 (expansive path) を持ち，Overlap-tile 法による入出力形式を採用している．また，Data Augmentation 処理によって，少数の訓練用データによる効率的な学習を実現している．以下でこれらについて [8] を参考に説明する．

3.2.1 Data Augmentation

U-Net では，教師付きデータに対して処理を適用し訓練用画像を増殖することで少ない訓練用画像から高い精度の学習を行う機能が採用されている．生体画像は多くの教師付きデータを用意する事が困難であるため，訓練用画像の増殖による少ないデータ数での訓練はバイオイメージインフォマティクスにおいて重要な機能である．その具体的手法として，今回は以下の処理を用いた．

- 画像に対する 90 度倍数の回転 (rotation)

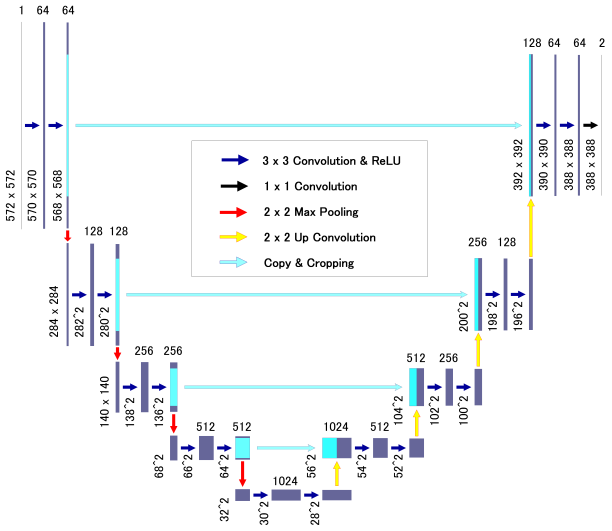

図 4 U-Net を構成するレイヤーの構造.
Fig. 4 Architecture of layers constituting U-Net.

- 画像の反転 (mirroring)

3.2.2 収束経路 (contracting path)

収束経路は図 4 の左半分に位置し，特徴マップの解像度を低下させる．以下の層のセットの繰り返しによって構成され，特徴抽出を行う．

- (カーネルサイズ 3 x 3 の畳み込み (convolution) 層+ReLU(rectified linear unit) 層) x 2
- 間隔 2，カーネルサイズ 2 x 2 の Max pooling 層

Max pooling 層によるダウンサンプリング処理で特徴マップの数が 2 倍になる．

3.2.3 拡散経路 (expansive path)

拡散経路は図 4 の右半分に位置し，特徴マップの解像度を上げる．以下の層のセットの繰り返しによって構成され，入力画像におけるセグメンテーションを決定する．

- カーネルサイズ 2 x 2 の up-convolution 層
- 対応する収束経路の特徴マップをコピーし外挿 (cropping 層)
- (カーネルサイズ 3 x 3 の畳み込み (convolution) 層+ReLU(rectified linear unit) 層) x 2

up-convolution 層によるアップサンプリング処理で特徴マップの数が半分になる．

拡散経路における cropping 層は，U-Net において非常に重要な役割を持つ．通常，CNN では畳込みとプーリング処理を経る毎に特徴マップ内の特徴の位置感度が失われる．これに対し，図 4 で水色の矢印を向けている収束経路の特徴マップをコピーし拡散経路の特徴マップと共に畳み込み処理を行うことで，境界の情報を保持と特徴抽出の両立が可能となる．

3.2.4 Overlap-tile 法

Pixelwise Classification では全ての画素を個別に入力として扱うが，この方法では一枚の画像に対する処理全体を通して膨大な計算を要することになる．そこで，U-Net ではミニバッチと呼ばれる複数の入力の集合をセットとして扱う入力形式を採用しており，これを Overlap-tile 法によって実装している．Overlap-tile 法では入力として与えられた画素のセットに対して，その周囲の画素を用いて図 4 のレイヤー処理を行い，セグメンテーション結果を出力する．その処理を示した図が**図 5** である．図 5 における (a) の黄枠内の領域を入力して (b) の黄枠内のセグメンテーション結果を得るために，U-Net では黒枠内部の部分の情報を利用する．入力の不足している領域は，(a) の破線の外側部分のようにミラーリング処理を施して補われる．

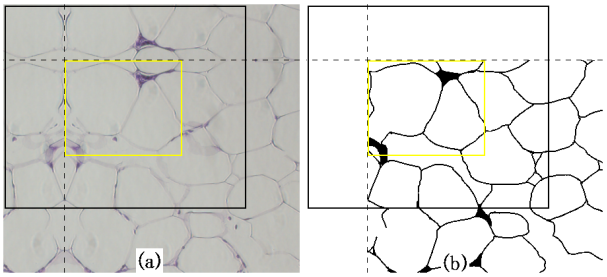

図 5 Overlap-tile 法によるセグメンテーションの処理前 (a) と処理後 (b) の例.
Fig. 5 Example of before(a) and after(b) segmentation processing by Overlap-tile method.

3.3 出力に対する後処理

図 4 のネットワークの出力結果として与えられる 2 枚の特徴マップは，それぞれ入力画素セットの同一位置での細胞である度合いと細胞でない度合いを示す．U-Net 最終的な出力は，これらの特徴マップに対してソフトマックス関数を用いられ，入力画像の各位置における脂肪細胞の存在確率を輝度値で表したグレースケール画像となる．ソフトマックス画像に対して，大津の二値化を施し二値画像への変換を行う．その後，二値画像に以下の処理を行う．この一連の行程を**図 6** に示す．

- 極端に小さい細胞部 (白い画素の集合) の除去（図 6 右上の赤で囲まれた部分など）
- 細胞部内の穴 (黒い画素の集合) を塞ぐ

4. 実験

CNN を用いたセグメンテーションと，その比較対象として Adipocytes Tools を用いた脂肪組織画像のセグメンテーションを行い，全ての出力結果に対して 3.3 の後処理を施した．それらの結果に対して教師画像に基づくエラー値による評価，比較を行った．

4.1 実験環境

Adipocytes Tools は [5] の web サイトで提供されているマクロを ImageJ 上で実行し，Single segmentation と

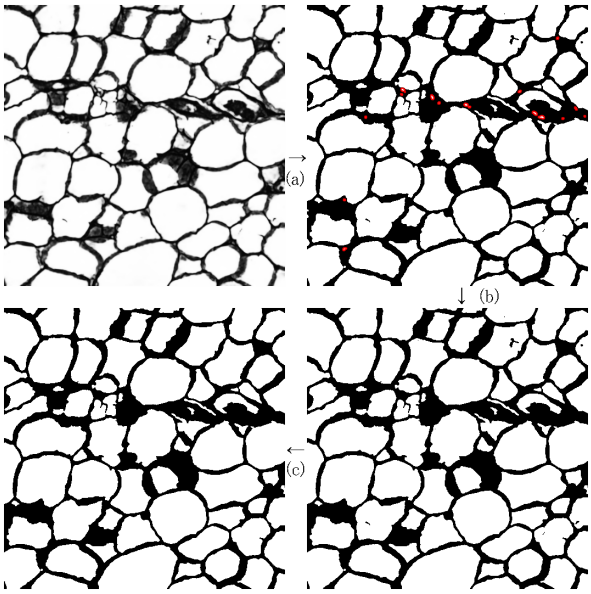

図 6 CNN の出力に対する後処理．(a) 大津法による二値化処理．(b) 小さい細胞部の除去．(c) 細胞部内の穴を塞ぐ．

Fig. 6 Post-processing for output of CNN. (a) Binary with Otsu's adaptive thresholding method. (b) Remove too small adipocytes. (c) Fill holes in adipocytes.

Watershed segmentation によるセグメンテーション結果を得た．CNN の実装環境として，Deep Learning 用フレームワーク Caffe [9] を Fabian Tschopp 氏 [10] が U-Net を含む Pixelwise Classification 用に改造し，GitHub にて公開している Caffe Neural Models を利用した．また CNN のネットワーク構造として，同氏によって提供されている Caffe Neural Models 内の unet-small を用いた．また，3.3 での後処理には，R [11] 用のバイオ画像処理用パッケージ，EBImage [12] を用いた．

4.2 実験データ

本研究では，[3] にて提供されている Adipocyte Quantification Tool 内のマウスの脂肪組織画像を用いている．これらの内，4 枚の画像を 512 x 512 サイズに分割した画像合計 16 枚を CNN の訓練用データに，2 枚の画像を同様に分割した画像合計 8 枚をテスト用データに用いた．その他に京都大学大学院農学研究科で得られたマウスの腹部脂肪組織画像の内，撮影環境が異なり特徴的なノイズを含まない画像を 2 枚（内 x200 拡大 2 枚），光の輪が入り込んだ画像 3 枚（内 x20 拡大 2 枚，x400 拡大 1 枚）をテスト用に用いた．

ここで用いるデータを 512 x 512 のサイズに変形したのは，CNN の実装環境の性能との兼ね合いと，Data Augmentation のための回転，反転処理が正方形の入力画像を想定しているためである．

subsection 評価方法各手法のセグメンテーション結果の評価は，Pixel error と Rand Error [13] への数値化によって行った．Rand error を算出するための Rand Index は，R 用パッケージ pdfCluster [14] で用意されている adj.rand.index 関数を用いて算出した．pixel error は画素全体に占める正解画像とセグメンテーション結果の差分（=ハミング距離）の割合であり，Rand error は各画素がどの程度正しくクラスタとして纏められているかを示す指標である．

表 1 pixel error

	#1	#2	#3
Simple	0.167	0.132	0.156
Watershed	0.264	0.109	0.142
CNN	0.0574	0.109	0.116

表 2 Rand error

	#1	#2	#3
Simple	0.490	0.586	0.644
Watershed	0.837	0.693	0.787
CNN	0.0574	0.439	0.870

4.3 実験結果

テスト用データは以下の 3 種類のデータを用いた．

- CNN の訓練に用いた画像と同じデータセット [3] の脂肪組織画像
- [3] と異なる環境で撮影された脂肪組織画像
- 図 2 のように Halo と呼ばれる光の輪が映り込んだ脂肪組織画像

ここでは，これらをそれぞれ#1,#2,#3 とする．各手法とテスト用データの組み合わせと，それに対応する pixel error と Rand error をそれぞれ**表 1**, **表 2** に示す．

4.4 考察

CNN によるセグメンテーション結果は，訓練に用いたものと同じデータセットに含まれる画像#1 だけでなく，訓練データとは異なる環境で撮影された画像#2 についても Adipocytes Tools のいずれの手法よりも精度が高いことが確認できた．また，CNN は pixel error において全ての画像に対して最も高い精度を記録している．

一方で，#3 に対する結果の Rand error について，CNN のエラー値が際立っている．#3 におけるセグメンテーション結果と元画像，正解セグメンテーションの比較画像を**図 7** に示す．異なる色で表される領域は，それぞれ以下の意味を持つ．

- 白：正解と各手法が共に細胞と判断した画素 (TP).
- 黒：正解と各手法が共に背景（細胞膜）と判断した画素 (TN).
- 赤：各手法のみが背景（細胞膜）と誤って判断した画素 (FN).
- 青：正解のみが背景（細胞膜）と判断した画素 (FP).

ⓒ 2016 Information Processing Society of Japan

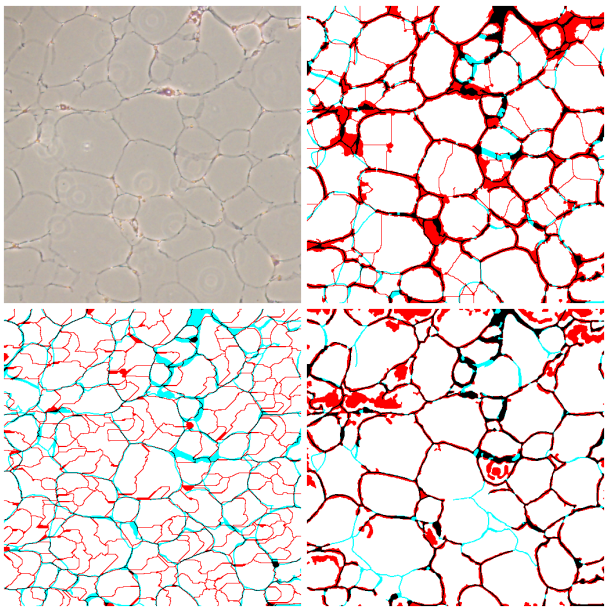

図 7 （左上）元画像#3.（右上）Simple segmentation,（左下）Watershed segmentation,（右下）CNN によるセグメンテーション結果と正解画像の比較.

Fig. 7 (Upper left) Original image #3. (Upper right) Resulting image of Simple segmentation, (Lower left) by Watershed segmentation, (Lower right) by CNN, each is compared with ground truth.

#3 について CNN では FP,FN の部分が目立っており，Rand error の高さの原因となっていると考えられる．#3 には光の輪以外にも，細胞の境界に白く光った部分があり，Adipocytes Tools の二つの手法は共にエッジ検出と Watershed 法を行うため白い境界部分の認識に成功している．このような特徴を持った画像は，二値化に頼ったセグメンテーションが困難である．二値化によるセグメンテーションは輝度によって細胞と背景を区別するため，細胞部分より輝度の高い背景を細胞として認識してしまうためである．今回の CNN の訓練モデルは二値化によるセグメンテーションと同様の弱点を抱えていると考えられる．

5. おわりに

本研究では，CNN(U-Net) での教師付き学習によるセグメンテーションが，訓練に用いた画像と似た特徴を持つ画像について従来の手法と比べて高い精度を誇ることを確認することができた．また，ただ精度が高いだけではなく，CNN による訓練は提供された状態のデフォルト値でも十分に高い精度の訓練済みモデルを得ることができる．実際に，今回の実験において学習率や重み付け遅延のパラメータ等を一切変更することなく，画像#1 と画像#3 に対する精度向上が実現できている．他のセグメンテーション手法と比較して複雑なパラメータ等の設定の必要がなく，訓練に用いる教師付きのデータセットを所定のディレクトリに置き，Caffe 上で訓練を実行するのみで高精度のセグメンテーション手段が得られることは，バイオイメージインフォマティクスの専門的知識を持たない科学者にとっても有意義な物であり，本研究はその有用性の証明の一端を担うことができたと考える．

謝辞 畳み込みネットワークの実装環境の提供をしていただきました Fabian Tschopp 氏に深謝致します．また，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] 内田誠一：バイオイメージインフォマティクスと画像情報学，電子情報通信学会誌，Vol. 98, No. 7, pp. 597–603 (2015).
[2] 小林徹也，青木一洋：バイオ画像解析手とり足とりガイド～バイオイメージングデータを定量して生命の形態や動態を理解する!，羊土社 (2014).
[3] Osman, OS., Selway, JL., Kepczynska, MA., et al.: A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantication, *Adipocyte*, pp. 160–164 (2013).
[4] Parlee, SD., Lentz, SI., Mori, H., et al.: Quantifying size and numberof adipocytes in adipose tissue, *Methods Enzymol.*, Vol. 537, pp. 93–122 (2014).
[5] Baecker, V., Lacroix, M. and Cavelier, P.: Adipocytes Tools.
[6] Mei, C.: *Watershed Algorithm* (2003).
[7] 岡谷貴之：機械学習プロフェッショナルシリーズ 深層学習，講談社 (2015).
[8] Ronneberger, O., Fischer, P. and Brox, T.: U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, (online), available from ⟨http://arxiv.org/abs/1505.04597⟩ (2015).
[9] Jia, Y., Shelhamer, E., Donahue, J., et al.: Caffe: Convolutional Architecture for Fast Feature Embedding, *arXiv preprint arXiv:1408.5093* (2014).
[10] Tschopp, F.: Efficient Convolutional Neural Networks for Pixelwise Classication on Heterogeneous Hardware Systems (2015).
[11] Ihaka, R. and Gentleman, R.: R: A Language for Data Analysis and Graphics, *Journal of Computational and Graphical Statistics*, Vol. 5, No. 3, pp. 299–314 (online), available from ⟨www.r-project.org⟩ (1996).
[12] Pau, G., Fuchs, F., Sklyar, O., et al.: EBImage-an R package for image processing with applications to cellular phenotypes., *Bioinformatics*, Vol. 26, No. 7, pp. 979–981 (online), available from ⟨http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq046⟩ (2010).
[13] Jain, V., Bollmann, B., Richardson, M., et al.: Boundary Learning by Optimization with Topological Constraints, *Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, pp. 2488–2495 (online), DOI: 10.1109/CVPR.2010.5539950 (2010).
[14] Azzalini, A. and Menardi, G.: Clustering via Nonparametric Density Estimation: The R Package pdfCluster, *Journal of Statistical Software*, Vol. 57, No. 11, pp. 1–26 (2014).

ⓒ 2016 Information Processing Society of Japan