

深層畳込みニューラルネットワークを用いた電子顕微鏡画像スタックにおける細胞セグメンテーションの実用的方法

小西功記*, 三村正文*, 野中崇雄**, 佐瀬一郎***, 西岡秀夫****, 須賀三雄****

Practical method of cell volume segmentation in electron microscope image stack using deep convolutional neural network

Kohki KONISHI*, Masafumi MIMURA*, Takao NONAKA**, Ichiro SASE***, Hideo NISHIOKA**** and Mitsuo SUGA****

生物組織などの連続した電子顕微鏡 (SEM, TEM) 画像のスタックから、三次元再構築し、目的の構造物を抽出すること (セグメンテーション) は、構造に対する専門の知識と時間のかかる作業である。畳込みニューラルネットワーク (CNN) は、セグメンテーションの作業を自動的に行うことを目的に使用されているが、大量の学習データセットと高性能のコンピューターが必要であることが大きなボトルネックである。この課題を解決するために、我々は最小限の学習データを用いて目的の構造物を抽出できるように CNN を改良した。我々はマウス小脳の連続 SEM 画像から10枚の学習データセットを作成し、これを用いて細胞膜確率マップを推定した。これを利用して2労働日弱 (手作業9時間) でプルキンエ細胞の樹状突起の細胞膜を抽出できた。この手法は、少量の学習データの作成のみで可能であり、計算時間も短くすることができるので従来手法よりも作業時間を大幅に減少させることができた。さらに同一の細胞膜確率マップを用いてプルキンエ細胞近傍の軸索突起やグリア細胞等の細胞膜を短時間で効率よくセグメンテーションすることができた。この手法は、少数の学習データセットを用いた、目的構造物の抽出作業効率化手法であると結論づけた。

Segmentation of three-dimensional electron microscopy image stacks is an arduous and tedious task. Deep convolutional neural networks work well to automate the segmentation; however, they require a large training dataset, which is a major impediment. In order to solve this issue, especially for sparse segmentation, we used a CNN with a minimal training dataset of cell membrane. We applied our CNN model to create membrane probability map. We then segmented a Cerebellar Purkinje cell from an image stack of a mouse Cerebellum cortex in less than two working days, which is much shorter than that of the conventional method. We further segmented several cells close to the Purkinje cell by utilizing the same membrane probability map as used to segment the Purkinje cell. Assisted by the probability map, segmentation process was more efficient than manual segmentation method. We concluded that we can reduce the total labor time for the sparse segmentation by reducing the training dataset.

Key words 画像セグメンテーション, マウス小脳, 畳込みニューラルネットワーク, 電子顕微鏡三次元画像
image segmentation, mouse Cerebellar cortex, deep convolutional neural network, electron microscopy image stack

1 はじめに

生物組織などの連続した電子顕微鏡 (SEM, TEM) の画像スタックを三次元再構築し、そこから目的物の三次元構造を抽出すること (セグメンテーション) は、目的の構造の理解、また目的構造とその近傍構造との空間的な位置関

係理解のために不可欠である。一般的な明暗調整や画像処理を用いた手法では生物組織画像などからの目的構造抽出はうまくできないことが多いため、手動でのセグメンテーションが広く受け入れられており、いくつかのツールが提供されている (Reconstruct¹⁾ など)。しかし、このようなツールを使用した手動のセグメンテーションは、連続切片

* 研究開発本部 数理技術研究所

** 光学本部 第一開発部

*** ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部

**** 日本電子株式会社

画像の大きさと枚数が増えるほど時間がかかり、面倒である。そこで、機械学習を使用した自動セグメンテーション手法が研究されてきた（例：ilastik²⁾, TrakEM2³⁾, Microscopy Image Browser⁴⁾）。

畳込みニューラルネットワーク（CNN）は、動物の視野を構成するニューロンの配置をヒントにして設計されたネットワークであり⁵⁾、セグメンテーションなどのパターン認識に適している。神経系の接続全体をマッピングするコネクトームでは、学習データと計算機を豊富に用意してCNNを用いて細胞形態を学習し、セグメンテーションを行っている⁶⁾。

セグメンテーションの手法は、学習データセットの作成、学習、適用、校正、三次元再構築の5つのプロセスから構成される。

この学習を行うためには学習データセットが必要である。学習データセットとは、撮影画像そのものと、この画像から目的構造物を抽出した正解画像のペアからなる。例えば、細胞膜を学習させたい場合、細胞膜の領域を含んだ画像とその画像の各ピクセル毎に細胞膜領域とそれ以外の部分を示す2値化された画像（正解画像）のペアを作成する。学習とは、学習データセットを用いてアーキテクチャを学習させ、学習済みモデルを出力させるプロセスである。適用は、撮影画像を学習済みモデルに入力し、細胞膜の確率マップを出力するプロセスである。校正は、元画像と閾値処理した細胞膜の確率マップとを比較することで、偽陽性と偽陰性領域を同定し修正するプロセスである。三次元再構築は、異なる切片にある同じ細胞に同じラベルを付けるプロセスである。

Januszewskiらはキンカチウ脳の連続電子顕微鏡画像のセグメンテーションにおいて平均エラーフリー神経突起経路長1.1 mmを達成した⁷⁾。これを達成するために、手動でセグメンテーションし、148メガボクセルの学習データセットと32のグラフィックスプロセッシングユニット（GPU）を使用している。しかし、彼らが使用した大量の学習用データセットを準備でき、かつ潤沢な計算機資源を持つことのできるラボは一般的ではない。少ない学習データと一般的な（安価な）計算機のみで、細胞やオルガネラの形態をセグメンテーションできれば、一般的なラボでもこの技術を使用でき、生物の三次元形態の理解を進める役に立つだろう。そこで我々は、マウスの小脳の分子層の連続電子顕微鏡画像の細胞膜を手動でセグメンテーションして10メガボクセルの学習データセットを作成し、細胞膜の特徴を学習させることにより、細胞膜の確率マップを推定した。このマップを用いてのプルキンエ細胞の樹状突起のセグメンテーションでは、総作業時間が従来法と比べて大幅に短縮できることを報告した⁸⁾。本稿では追加事例を含めて提案手法を紹介する。

2 手法

(1) 試料の作成

深麻酔後、成体マウスを0.1 mol/l カコジル酸緩衝2% グルタルアルデヒド（pH 7.5）で灌流固定した。続いて小脳を摘出し、同じ固定液で2時間浸漬固定した。その後0.1 mol/l カコジル酸緩衝1% OsO₄（pH 7.5）で2時間後固定した。標本を段階的にエタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。

包埋した試料はウルトラミクロトーム（Leica EM UC7; Germany）により連続超薄切片を作製した。切片厚の設定値は45 nmである。切削した切片をシリコン基板片に載せ、酢酸ウラニルとレイノルドのクエン酸鉛により2重染色した。

(2) 連続SEM像の撮影

上記連続切片は、アレイトモグラフィ⁹⁾用のカスタムソフトウェアを備えた2つの走査型電子顕微鏡（SEM）、JSM-7800FとJSM-7900Fを用いて自動撮影した。ピクセルサイズは6 nm、画像サイズは5120×3840ピクセルである。加速電圧は7 kV、検出器は後方散乱電子（BSE）検出器を用いて、連続超薄切片97枚の連続SEM像を取得した。連続SEM像間の位置合わせは、Fijiのプラグインであるlinear stack alignment with the SIFTを使用した。続いて小脳のプルキンエ細胞の樹状突起を含んだ領域を2048×2048ピクセルでトリミングした。

(3) セグメンテーションの提案手法

我々の提案手法も学習データセットの作成、学習、適用、校正、三次元再構築の5つのプロセスから構成される。

学習データセットの作成

上記、2048×2048の元画像97枚の中央部分の1024×1024領域を切り出し、ここから10枚を選択し細胞膜部分を手動で塗り分け2値化画像を作成し、学習データセットを作成した。この10枚は、細胞膜の様々なテクスチャパターンと典型的なテクスチャパターンを含むように選択した（切片番号：1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 50, 70, 90）。テクスチャは連続切片間で類似しており、切片が離れるにつれて画像の変化が大きくなると仮定している。作成した学習データセットは、従来法⁵⁾の1/10である。

学習

学習には、学習データセットが少ないため、データ拡張を行った。各画像に回転（0°, 90°, 180°, 270°）と反転（垂直反転、水平反転、反転なし）、弾性変形¹⁰⁾を加えることにより、学習データサイズを16倍まで拡張させた。弾性変形は、画像内のいくつかの点を選択し、それらの点をある程度ランダムな方向に動かしたのち、残りのピクセルを補間する変形である。我々はエンコーダ・デコーダタイプ

のセグメンテーションアーキテクチャ U-Net¹¹⁾ を学習に用いたが、学習データサイズが小さくても過学習しにくくするために畳込み層数やプーリング層数を減らしている。

学習部の実装：学習部の実装には Caffe フレームワーク¹²⁾ を用いた。最適化には確率的勾配降下法ソルバーである ADAM¹³⁾ を使用した。初期学習率、第1と第2の減衰率、重み減衰率はそれぞれ $1e-4$, 0.9 , 0.99 , $4e-3$ とした。学習率は反復計算の間中、固定した。計算を高速化するため GPU を1枚 (NVIDIA GeForce GTX 1080) だけ使用した。

適用

適用は、小脳プルキンエ細胞の樹状突起を含んだ領域 (2048×2048 ピクセル) 97枚をそれぞれ学習済みモデルに入力し、細胞膜確率マップを97枚出力した。推定は、文献¹⁴⁾ に倣い、入力画像をデータ拡張して行い、その平均出力を細胞膜確率マップとした。

校正と三次元再構築

適用の結果出力された97枚の細胞膜の確率マップと元の SEM 画像を比較し、目的のプルキンエ細胞の樹状突起の細胞膜、それを覆うグリア細胞の細胞膜、周辺の軸索の細胞膜などの偽陽性と偽陰性領域を手動で修正しセグメンテーションを行った。

(4) セグメンテーションツール

我々は、上記の5つのプロセスをすべてオールインワンで実施可能なセグメンテーションツールを開発した。本ツールは一般的な (ゲーム用途の) GPU を搭載した Windows OS で動作する。また、誰でも簡単に深層学習を用いたセグメンテーションができるように、独自のグラフィカルユーザインターフェース (GUI) を持っている。Fig. 1 に我々が開発したセグメンテーションツールを用い

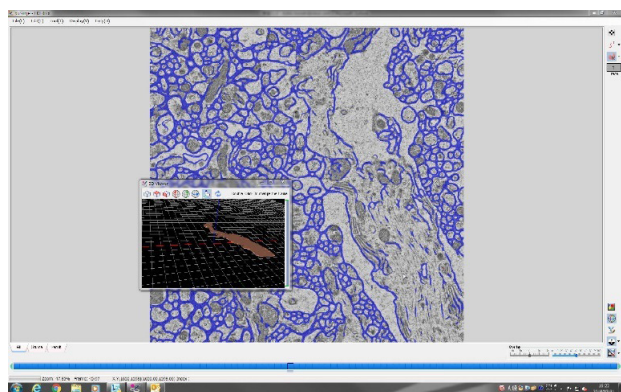


Fig. 1 深層学習を用いたセグメンテーションツール

学習データセットの作成、学習、適用、校正、三次元再構築の各プロセスを本ツールを用いて実行できる。Fig. 1 は細胞膜の推定結果の校正とプルキンエ細胞の樹状突起の三次元構築中を示すスクリーンショットである。本ツールは GPU を搭載した Windows OS で動作する。

た本実験の様子を示す。

3 実験

我々は開発したツールを用いて小脳のプルキンエ細胞の樹状突起をセグメンテーションし、各セグメンテーションプロセス (学習データセットの作成、学習、適用、校正、三次元再構築) に要した時間を記録した。さらに提案手法に要した時間評価を、2つの既存セグメンテーション法と比較した。1つは全手動でセグメンテーションを行う方法 (以下、Method 1)、もう1つは従来の機械学習セグメンテーション法 (以下、Method 2⁵⁾) である。全手動法は、プルキンエ細胞の樹状突起の細胞膜を全手動でトレーシングし、樹状突起の細胞質全体に同じ色を塗った。Method 2 は、学習データセットを100枚とした以外は、提案手法と同じである。学習データセットのサイズは提案手法の10倍となる。各プロセスにかかった時間を記録する。

4 結果と考察

出力された細胞膜の確率マップの一例を Fig. 2 に示す。結果を SEM 画像と見比べると、誤検出がみられる。細胞膜の一部が未検出な領域や、本来繋がっていない細胞膜同士が繋がっている例もあった (Fig. 3)。Fig. 3 は、Fig. 2 の

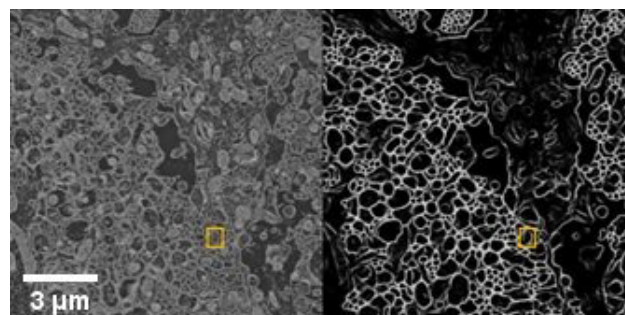


Fig. 2 SEM 画像 (左) と細胞膜の確率マップ (右)

図中に示したオレンジ色のボックス領域は、誤結合と誤分割領域の例である。Fig. 2 は許可を得た上で転載 (文献⁸⁾)、copyright 2019 Oxford Academic.

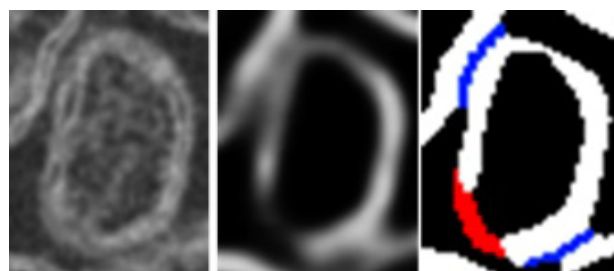


Fig. 3 校正の例

Fig. 2 のオレンジ色のボックス領域の拡大 Fig. (左)、細胞膜の確率マップ (中央)、校正結果 (右)。右 Fig. の黒、白、青、赤は、それぞれ真陰性、真陽性、偽陽性、偽陰性領域を示す。Fig. 3 は許可を得た上で転載 (文献⁸⁾)、copyright 2019 Oxford Academic.

オレンジ色のボックス領域の拡大像である。Fig. 3 左は元の SEM 画像，Fig. 3 中央は対応する細胞膜の確率マップ，Fig. 3 右は校正結果例である。Fig. 3 右の黒，白，青，赤は，それぞれ，真陰性（細胞膜がないと判定），真陽性（細胞膜があると判定），偽陽性（細胞膜がないのにあると判定），偽陰性（細胞膜があるのにないと判定）と評価した領域である。

この結果は，学習データセットが少なく，かつ学習アーキテクチャの表現能力を制限して計算時間を短くしたため，誤検出が増えたためと考えられる。しかし，誤検出の校正は比較的簡単なので全手動で行うセグメンテーションと比べるとはるかに省力化できたと考えられる。

Fig. 4 に切片番号71のコントラスト反転した SEM 画像（左）と，小脳のプルキンエ細胞の樹状突起のセグメンテーション結果（右）を示す。

Table 1 と Fig. 5 で，今回の提案手法と2つの既存手法（Method 1, 2）の手作業にかかった時間を比較した。既存手法の1つは完全に手作業による手法（Method 1）であり，もう1つは CNN を用いた従来手法（Method 2, 学習データセット100枚）である。提案手法の各プロセスの手作業時間を測定した結果，細胞膜のトレーシング（Fig. 5 の青部分），校正（Fig. 5 の赤部分），三次元再構築（Fig. 5 の緑部分）にそれぞれ約150分，250分，50分を要した。これらの結果をもとに，Method 1 と Method 2 を実施した場合の作

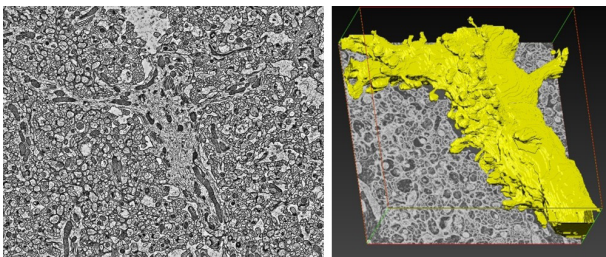


Fig. 4 SEM 像（左，コントラスト反転）と小脳分子層のプルキンエ細胞樹状突起のセグメンテーション結果（右，黄色） Fig. 4 は許可を得た上で変更して転載（文献⁸⁾），copyright 2019 Oxford Academic.

業時間を推定した。推定の詳細は Table 1 のキャプションに記載している。学習データサイズが小さいため校正時間は増加したものの，提案手法は従来手法⁵⁾と比較して総手動セグメンテーション時間を70%短縮した。

我々が開発したセグメンテーションツールは，確率マップを元画像の上にかぶせる機能があり，トレーシング補助として使用できるため，手動セグメンテーションと比べると画像の校正が簡単にできる。この機能を利用し，同じ細胞膜の確率マップを用いて，プルキンエ細胞近傍の軸索突起やグリア細胞等のセグメンテーションを実施した。Fig. 6 に樹状突起（灰色），軸索（青色と緑色），シナプス結合部（赤色），グリア細胞（ピンク色）のセグメンテーション結果を追加で示す。この確率マップは，画像内の他の細胞のセグメンテーションに利用できることが分かる。

我々はマウスの小脳の細胞膜の特徴を CNN アーキテクチャに学習させることでプルキンエ細胞の樹状突起のセグメンテーションを実施した。もしマウス小脳の細胞膜に類似した公開データがあれば，転移学習を用いたセグメンテーションが可能かもしれない。ISBI 2013 EM challenge の SNEMI 三次元データセット¹⁵⁾ はマウス大脳皮質の連続

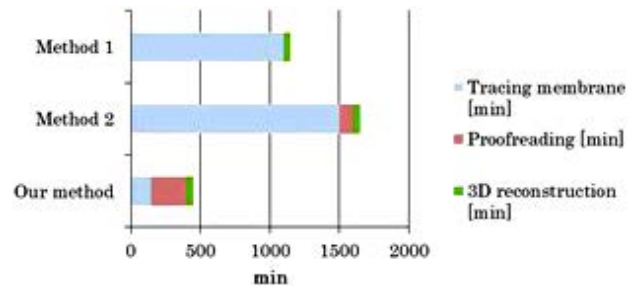


Fig. 5 従来手法との手作業時間比較

提案手法（Our method）を従来手法1（完全手作業によるセグメンテーション手法；Method 1）と従来手法2（CNNを用いた従来手法によるセグメンテーション手法；Method 2）と比較した。三次元再構築までの総作業時間は，学習データセットを減らすことによって短縮されることが分かる。Fig. 5 は許可を得た上で変更して転載（文献⁸⁾），copyright 2019 Oxford Academic.

Table 1 提案手法と従来手法の手作業時間比較

	膜トレーシング (分) (Tracing membrane (min))	校正 (分) (Proofreading (min))	3D再構築 (分) (3D reconstruction (min))	総作業時間 (h)
提案手法 (Our method)	150	250	50	9
手法1 (Method 1)	1,100*1	0	50*4	20
手法2 (Method 2)	1,500*2	100*3	50*4	28

提案手法の各プロセスの手作業時間を測定した。手法2では，細胞膜のトレーシング時間は学習データセット作成時間に対応する。手法1と2での作業時間推定は次の通り。我々の学習データセットと小脳プルキンエ細胞データの膜ピクセル数を比較したところプルキンエ細胞膜のピクセル数は7.3倍であったため，手法1の膜トレーシング作業時間は $150 \times 7.3 = 1,100$ 分と推定した。ISBI 2013 EM challenge のデータセットサイズは我々の学習データセットサイズの10倍大きいので，手法2の膜トレーシング作業時間は $150 \times 10 = 1,500$ 分と推定した。手法2における校正のための作業時間は，各画像に1分を要すると仮定して推定した。3D再構築のための作業時間は手法とは無関係に一定である。

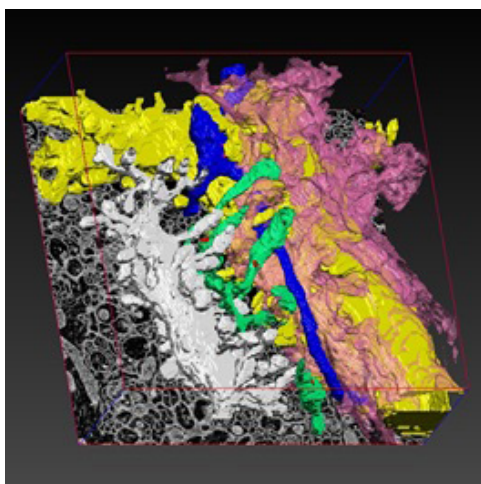


Fig. 6 プルキンエ細胞に隣接する複数細胞のセグメンテーション結果

樹状突起1 (黄色), 樹状突起2 (灰色), 軸索 (青色と緑色), シナプス結合部 (赤色), グリア細胞 (ピンク色).

切片の連続 SEM 像であり, 学習データセットが公開されている. このデータセットを用いて我々が提案する手法で学習し, 我々の画像に適用する転移学習を試みた. 結果は Fig. 2 に示した結果ほど良くなく, 画像中の約80%のミトコンドリアを細胞膜と誤認識してしまっていた. これは, 学習に用いた試料と, 本稿で用いた試料の組織と固定法・染色法などの違いによるものと考えられる. 異なる組織や固定法で作製した試料への適用は, 今後の課題である.

5 まとめ

生物組織などの連続電子顕微鏡画像の三次元再構築像から目的の構造物をセグメンテーションする作業は, 構造に対する専門の知識と時間のかかる作業であり, 深層学習を用いた取り組みはなされているものの, 大量の学習データセットと高性能のコンピューターが必要であることが大きなボトルネックである. そこで我々は Windows PC で動作し, 少ない学習データでセグメンテーション可能なツールを開発した. プルキンエ細胞の樹状突起の抽出に本ツールを適用し, 従来手法よりも作業時間を大幅に減少させることができた. 生物組織の構造を三次元的に把握することは生命現象の理解に大切であり, 本ツールを用いた三次元形態の理解促進の効率化が期待される.

参考文献

- 1) Fiala, J.: *Journal of Microscopy*, **218** (2005), 52-61.
- 2) Sommer, C., Straehle, C., Koethe, U. and Hamprecht, F.: *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 2011.
- 3) Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., Tomancak, P., Hartenstein, V. and Douglas, R. J.: *PLoS ONE*, **7**, 6 (2012), 1-8.
- 4) Belevich, I., Joensuu, M., Kumar, D., Vihinen, H. and Jokitalo, E.: *PLoS Biology*, **14** (2016), 1-13.
- 5) Hubel, D. and Wiesel, T.: *Journal of Physiology*, **195** (1968), 215-243.
- 6) Arganda-Carreras, I., Turaga, S., Berger, D., Ciresan, D., Giusti, A., Gambardella, L., Schmidhuber, J., Laptev, D., Dwivedi, S., Buhmann, J., Liu, T., Seyedhosseini, M., Tasdizen, T., Kamensky, L., Burget, R., Uher, V., Tan, X., Sun, C., Pham, T., Bas, E., Uzunbas, M., Cardona, A., Schindelin, J. and Seung, H.: *Frontiers in Neuroanatomy*, **9** (2015), 1-13.
- 7) Januszewski, M., Kornfeld, J., Li, P., Pope, A., Blakely, T., Lindsey, L., Maitin-Shepard, J., Tyka, M., Denk, W. and Jain, V.: *Nature Methods*, **15** (2018), 605-610.
- 8) Konishi, K., Mimura, M., Nonaka, T., Sase, I., Nishioka, H. and Suga, M.: *Microscopy*, (2019), 338-341.
- 9) Micheva, K. and Smith, S.: *Neuron*, **55** (2017), 25-36.
- 10) Simard, P. Y., Steinkraus, D. and Platt, J. C.: *Seventh International Conference on Document Analysis and Recognition*, 2003.
- 11) Ronneberger, O., Fischer, P. and Brox, T.: *International Conference on Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention*, 2015.
- 12) Jia, Y., Shelhamer, E., Donahue, J., Karayev, S., Long, J., Girshick, R. B., Guadarrama, S. and Darrell, T.: *ACM Multimedia*, 2014.
- 13) Kingma, D. and Ba, J.: *Proceedings of the 3rd International Conference on Learning Representations*, 2015.
- 14) Beier, T., Pape, C., Rahaman, N., Prange, T., Berg, S., Bock, D. D., Cardona, A., Knott, G. W., Plaza, S. M., Scheffer, L. K., Koethe, U., Kreshuk, A. and Hamprecht, F.: *Nature Methods*, **14** (2017), 101-102.
- 15) SNEMI3D, "http://brainiac2.mit.edu/SNEMI3D/".