

Title	バイオイメージングデータを用いた細胞動態解析のた めの細胞追跡に関する研究
Author(s)	藤本, 健二
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92000
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

バイオイメージングデータを用いた 細胞動態解析のための 細胞追跡に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2023年1月

藤本 健二

関連発表論文

1. 学術論文

1-1. Kenji Fujimoto, Shigeto Seno, Hironori Shigeta, Tomohiro Mashita, Masaru Ishii, and Hideo Matsuda. Tracking and Analysis of FUCCI-Labeled Cells Based on Particle Filters and Time-to-Event Analysis. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (IJBBB), International Academy Publishing, Vol. 10, No. 2, pp. 94–109, April, 2020 (博士論文第 2 章).

2. 国際会議

2-1. Kenji Fujimoto, Tsubasa Mizugaki, Utkrisht Rajkumar, Hironori Shigeta, Shigeto Seno, Yutaka Uchida, Masaru Ishii, Vineet Bafna, and Hideo Matsuda. A CNN-based Cell Tracking Method for Multi-Slice Intravital Imaging Data. In Proceedings of the 12th ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics (BCB '21), August, 2021 [oral presentation] (博士論文第 3 章).

内容梗概

細胞の移動 (遊走),状態や機能の変化,増殖,分化といった動的な変化,すなわち動態 (ダイナミクス) は生物の体内で発生する様々な生物学的プロセスに関与する. 癌細胞の 無秩序な増殖に代表される細胞動態の異常は,癌等の重大な疾患の要因となり,異常動態 の抑制や細胞死の誘導によって疾患に抵抗する薬剤も開発されている. こうした細胞動態 の性質,機序,制御機構等の解明は,生物学,医学,薬学分野の研究に貢献すると期待さ れる.

細胞動態の解明には、様々な細胞を可視化するバイオイメージングが重要な役割を果た している.特に蛍光顕微鏡や蛍光タンパク質による蛍光イメージング技術により、細胞を 生きたまま観察し、その移動や形状変化、分裂・増殖を動画像(タイムラプス画像系列) として記録することが可能となっている.蛍光タンパク質を発展させた蛍光プローブは、 細胞内分子との化学反応によって蛍光特性(蛍光色や蛍光強度)を変化させる機能性分子 であり、これによって個々の細胞の状態の変化も可視化される.また、2光子励起顕微鏡 に代表される生体内イメージング技術により、生体内(in vivo)で実際にはたらいている 細胞の動態を3次元(3D)で観察することも可能になりつつある.

イメージングによって得られた動画像を用いて細胞動態を解析するには、細胞の位置や 状態の履歴といった動態情報を動画像から抽出する必要がある.なかでも細胞の移動軌跡 (位置の時系列)は、長期的な動態(細胞の発生から分裂までの状態変化や、環境要因によ る細胞の移動傾向の変化)を解析する上で有用である.動画像から個々の細胞の移動軌跡 を抽出するタスクは細胞追跡と呼ばれ、これまでに多数の方法が提案されている.しかし ながら、蛍光イメージングデータでは「細胞の外観の変化」や「外観の類似した細胞の密 集・重畳」といった特有の要因から、追跡対象の細胞を見失ったり他の細胞と取り違えた りする追跡誤りが発生しやすく、長期的な移動軌跡の抽出、すなわち細胞の継続的な追跡 は困難な課題となっている.

本研究では最初に、細胞が分裂に至る一連の過程である細胞周期の解析のための、蛍光 プローブ Fucci (fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator)を導入した細胞 の追跡手法を提案する.細胞の増殖は、通常は種々の分子による細胞周期の進行と停止を 通じて制御されているが、癌細胞はそうした制御機構を無視して無秩序に分裂・増殖す る.一方、ある種の抗癌剤は細胞周期に特異的に作用する (DNA 複製の阻害等) ことで 癌細胞の増殖を抑制することが知られている.こうした抗癌剤の薬効や作用機序の解明に は、様々な条件における細胞周期の時系列(履歴)の解析が有用と期待される.Fucci は細 胞周期の状態(進行度合い)を、細胞核の蛍光色を赤色、黄色、緑色の順に変化させること で可視化する蛍光プローブであり、動画像からFucci 導入細胞を追跡することで、細胞ご との細胞周期の時系列を抽出し解析できるようになる.しかしながら細胞ごと・フレーム ごとに蛍光強度が大きく変動する、細胞周期進行に伴って急速に蛍光色が変化するといっ た細胞の外観の経時変化により、従来の方法では個々の細胞を見失ったり取り違えたりせ ずに継続して追跡することが困難であった.これに対し本研究で提案するのは、一時的な 追跡対象の隠れ(オクルージョン)に頑強なパーティクルフィルタ法に、細胞周期の進行 (状態変化)に伴う色変化を予測しながら追跡する機構を組み込んだ細胞追跡手法である. 提案手法の継続的追跡の性能を実際のイメージングデータを用いて示すとともに、細胞周 期解析への応用を見据え、提案手法の追跡結果に細胞周期の多状態イベントヒストリ解析 を適用し、抗癌剤の投与条件による癌細胞の細胞周期進行の差異を明らかにする.

次に,細胞の遊走軌跡解析のための,3D イメージングデータにおける深度情報を考慮 した細胞追跡手法を提案する. 遊走は、細胞が何らかの刺激に応答して異なる場所に移動 する現象であり、生物の発生段階から成体に至るまで様々な生命現象に関与する.細胞ご との移動軌跡から移動傾向やその変化を解析することは、遊走を理解するための基本的な アプローチとなっている.2光子励起顕微鏡による生体内イメージングは,生体内の細胞 遊走を可視化できるため,得られた動画像における細胞追跡によって細胞遊走の軌跡解析 が可能となり得る.しかしながら,個々の細胞が同じ蛍光色の塊として可視化されるた め、それぞれを外観で区別することが容易ではなく、細胞追跡における追跡対象の取違 えの原因となる. こうしたデータには、高い表現力を有する特徴抽出器を「正解」付きの データで訓練 (最適化) する深層学習の有効性が期待される. ただし, 訓練データに「正 解」を付与するアノテーションに人力での細胞追跡が必要であるため, 3D 動画像をその まま扱う場合のコストが膨大で、従来は平面上の座標ごとに深度方向の最大値を選択して いく最大値投影法 (MIP) でいったん 2D の動画像に変換してから訓練・追跡が行われて いた.MIP は深度情報を保持せず,異なる深度に分布する細胞群を 1 枚の 2D 画像上に 投影するため, 2D 平面上の位置が近接していたり重畳していたりする細胞群が一体とし て描画されてしまい、深層学習による方法であっても取違えや見失いを防ぐことが難し かった.これに対し本研究が提案するのは、2D動画像における深層学習に基づく物体追 跡手法を,深層学習モデル自体の構造や入出力は変更せずに 3D 動画像からの細胞追跡に 適用できるよう拡張し,密集・重畳した細胞を深度で区別しながら追跡する方法である.

iv

提案手法の継続的追跡の性能を実際のイメージングデータを用いて示すとともに、細胞遊 走の解析への応用を見据え、提案手法で抽出した細胞の移動速度の時系列を解析し、刺激 の違いによる免疫細胞の移動傾向の差異を明らかにする.

本研究の成果は、「追跡対象の外観変化」ならびに「外観の類似した追跡対象の密集」と いう蛍光イメージングデータに遍在する課題について、前者は細胞の状態を、後者は細胞 の深度を推定・活用することで一定の解決を与える.提案手法自体は対象となるデータに 応じて設計されているが、異なる状態空間への拡張や 2D 画像からの深度推定の手法との 組合せによって、幅広いイメージングデータにおける細胞追跡に資すると期待される.ま た、細胞動態解析のための細胞追跡は、従来は主に手作業または半自動で行われていた. これに対し計算機による高精度な細胞追跡手法を提案し、細胞動態解析への応用可能性を 示した本研究の成果は、細胞動態研究を効率化し、客観的かつ再現性のある研究に資する と考えられる.

目次

第1章	序論	1
1.1	研究背景	1
1.2	研究目的	6
1.3	本博士論文の構成	6
釣り立	如時用期短七のための特許が少の支援に甘べく勿時道時	0
- 第 ∠ 早	神記周期時間のための状態変化の予測に基づく神記追跡	ð
2.1	相言	8
2.2		9
2.2.	1 細胞周期解析の重要性	9
2.2.	 Fucci を用いた細胞周期解析	10
2.3	Fucci 導入細胞の追跡の意義.............................	11
2.4	従来の細胞追跡手法とその問題点.........................	12
2.4.	1 検出と対応付けに基づく方法	12
2.4.	2 パーティクルフィルタ法	15
2.5	状態変化の予測に基づく細胞追跡手法 (提案手法)	17
2.5.	1 概要	17
2.5.	2 提案手法	17
2.5.	3 細胞状態の推定	19
2.5.	4 尤度	22
2.5.	.5 蛍光減衰時の追跡	27
2.6	評価実験	29
2.6.	1 実験方法	29
2.6.	2 結果	33
2.6	3 老容	35
2.0.		38
2.1		40
2.8	仰口 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	40
第3章	細胞の遊走軌跡解析のための深度情報を考慮した深層学習による細胞追跡	42
3.1	緒言	42

3.2	細胞遊走のイメージング.............................	44	
3.2.1	1 細胞遊走	44	
3.2.2	2 2 光子励起顕微鏡による生体内 3 次元イメージング	44	
3.3	マルチスライス 3D 動画像における細胞追跡の意義..........	46	
3.4	従来の細胞追跡手法とその問題点......................	47	
3.4.1	1 深層学習に基づく細胞追跡	47	
3.4.2	2 マルチスライス 3D 動画像における細胞追跡...........	50	
3.5	深度情報を考慮した深層学習による細胞追跡 (提案手法)	52	
3.5.1	1 概要	52	
3.5.2	2 細胞追跡の方法	53	
3.5.3	3 MDNet の訓練方法	55	
3.6	評価実験	56	
3.6.1	1 実験方法	56	
3.6.2	2 結果	58	
3.6.3	3 考察	60	
3.7	追跡結果を用いた遊走軌跡解析	62	
3.8	結言	64	
第4章	結論	67	
謝辞		71	
参考文献			

第1章 序論

1.1 研究背景

細胞 (cell) はあらゆる生物における基本的な構成単位である.細胞の移動,状態遷移, 分裂・増殖,分化といった動的な変化は細胞動態 (cellular dynamics) と呼ばれ,生物の 体内で発生する様々な生命現象の鍵を握っている.例えば,動物や植物を含む多細胞生 物は受精卵の細胞分裂によって発生し,さらなる分裂と分化を経て組織や諸器官が形成 される.成体においても,皮膚等の組織を構成する細胞は常に分裂し,古い細胞と入れ 替わっている [1]. このように細胞が発生してから分裂に至るまでの過程は細胞周期 (cell cycle) [2] と呼ばれ, DNA の複製の開始・終了等の時点での進行・停止を通じて厳密に制 御されている [3].また,細胞が何らかの刺激を受けて移動する遊走 (migration) は,生 物の発生段階における諸器官の発達や神経系の形成に不可欠である [4,5].成体において も,細胞遊走は免疫応答や創傷治癒といった生物学的プロセスに密接に関与する [4].こ うした細胞動態の性質や機序,制御の仕組み等の解明は,生物を理解する上で重要な役割 を果たしている.

細胞動態は疾患や薬剤応答にも関与しており,医学や薬学・創薬の分野でも重要な研究 対象となっている.例えば突然変異によって遺伝子に異常を来した癌細胞は,細胞周期の 制御機構を無視して際限なく分裂・増殖する [2].増殖にかかる時間は細胞の種類や環境 等によって大きく異なるが,ヒト肝癌由来細胞株 HuH7 [6]の場合は40-60時間程度で細 胞数が2倍になることが確かめられている [7].増殖した癌細胞によって形成される悪性 腫瘍(癌)は、ヒトにとっても死につながる重大な疾患となっている.一方,抗癌剤の一 種である代謝拮抗剤やトポイソメラーゼ阻害剤は,細胞分裂の過程で起こる DNA 複製に 必要な酵素のはたらきを阻害することで,癌細胞の増殖を抑えるという機序が知られてい る [8].また,細胞遊走は生体を細菌やウイルス感染症から守る免疫応答において重要で ある.体内に侵入した細菌やウイルス,花粉等の異物を認識した免疫細胞は、サイトカイ ンと呼ばれる種々の化学物質を分泌することで,他の免疫細胞(好中球、マクロファージ、 T細胞等)を集結させ、それらの食作用や抗体産生によって異物が排除される [9].一方, 免疫系の異常が慢性炎症疾患 [10]や自己免疫疾患 [11]、アレルギー性疾患 [12]の原因と なることも知られており、免疫細胞の遊走を阻害することで疾患に抵抗する薬剤も開発さ れている [13].

こうした細胞動態の解明には、細胞や組織を顕微鏡で可視化するバイオイメージング (bioimaging) が重要な役割を果たしている.特に、生きた細胞の様子を一定時間ごとに 撮影するタイムラプスイメージング (time-lapse imaging) は、細胞動態を動画像とし て記録することを可能にする.タイムラプスイメージングに用いられる顕微鏡のうち、 位相差顕微鏡 (phase-contrast microscopy) や微分干渉顕微鏡 (differential interference contrast microscopy; DIC microscopy) は、試料の厚みや輪郭を無染色で可視化する. 蛍光顕微鏡 (fluorescent microscopy) は、試料の厚みや輪郭を無染色で可視化する. 蛍光顕微鏡 (fluorescent microscopy) は、試料中の特定の物質 (蛍光物質) の発する蛍光 (fluorescence) を画像化する.蛍光は、高エネルギーの光 (励起光)を吸収した蛍光物質 の電子がエネルギー準位の高い状態に遷移 (励起) した後、エネルギーを失って元の状態 に戻る際に放出する光である.蛍光顕微鏡では、試料に蛍光物質を結合させる蛍光標識 (fluorescent labeling) をあらかじめ施した上で特定の波長の励起光を照射し、放出され る蛍光を波長の違いで励起光から分離して検出する.蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージン グは、遺伝子組換えによって細胞内部に蛍光タンパク質 (fluorescent protein) 等を発現 させることで細胞を生きたまま標識できるため、その動態をタイムラプスイメージングで 記録することも可能としている.

近年の蛍光イメージング技術の発展は目覚ましく,培地上での細胞の配置や動きに とどまらず,より高次の情報を画像化できるようになりつつある.その代表例である蛍 光プローブ (fluorescent probe) は,細胞内分子との化学反応によって蛍光特性を変化 させる光機能性分子であり,細胞の状態や機能の変化を可視化する.蛍光プローブの例 として,本研究でも焦点を当てる Fucci (fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator) [14] が挙げられる. Fucci は細胞周期の進行度合いを赤色蛍光と緑色蛍光を用 いた色変化によって可視化することで,細胞の分裂・増殖の過程の観察を可能とする.ま た,2光子励起顕微鏡 (two-photon excitation microscopy) [15,16] は高い組織透過性と 低い侵襲性を特長とし,試料の表面だけでなく,生体の内部ではたらく細胞の観察をも可 能にしつつある.2光子励起顕微鏡では,撮像対象の焦点面以外の蛍光分子がほとんど蛍 光を放出しないため,焦点面を深度方向に移動させながら繰り返し撮像することで複数の 断層像 (スライス)の系列,すなわちマルチスライス 3D 画像という形式で生体内の 3 次 元 (3D) イメージングも可能である.このように様々な細胞動態を可視化できる点で,蛍 光イメージングはタイムラプスイメージングのなかでも特に動態解析に適した方法と言 える.

タイムラプス蛍光イメージングで得られた動画像データから細胞動態に関する知識を発

 $\mathbf{2}$

見するには、細胞の移動軌跡や状態変化の履歴といった動態情報を抽出し、目的に応じた 時系列解析を適用するという手順が基本となる.従来、こうした知識発見プロセスは主に 手作業、または ImageJ [17] 等の画像処理ソフトウェアを用いて半自動で実現されてき た.しかしながら、蛍光イメージング技術の発展は従来は観察できなかった様々な現象を 可視化し、結果として多種多様な実験系における膨大な量の動画像を産出している.さら にイメージングデータの高解像度化 [18]、データ取得の高スループット化 [19] も進んで いる.このような状況において手作業または半自動の解析は知識発見プロセス全体のボト ルネックとなると考えられるため、情報技術を用いた自動解析技術の開発が喫緊の課題と なっている.

イメージングデータに対する情報処理技術の研究領域はバイオイメージインフォマティ クス (bioimage informatics) [20–23] と呼ばれる.バイオイメージインフォマティクスで 研究されている方法論のうち,画像全体に関する情報を抽出するものとしては,画像分 類 (image classification) [24] と画像変換 (image-to-image translation) [25] が代表例で ある.画像分類は,近年発展の著しい深層学習技術である畳込みニューラルネットワー ク (convolutional neural network; CNN) との親和性が高く,癌細胞 [26–28],上皮細 胞 [29],神経前駆細胞 [30] といった幅広い細胞画像に適用されている.画像変換は,与 えられた画像について,内容を保ちながら異なるドメイン (スタイル)の画像に変換す るタスクであり,異種の顕微鏡 (例えば位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡)画像 [31–33], MR (magnetic resonance) 画像と CT (computed tomography) 画像 [34,35] といったペアの 間での相互変換を中心に広く研究されている.

イメージングで可視化された個々の細胞に関する知識を得るには、画像全体だけでなく 細胞ごとの情報抽出も重要となる. セグメンテーション (segmentation) は静止画像を対 象として、画像全体を細胞領域とそれ以外の背景領域に分割する (塗り分ける) タスクで ある. これにより各細胞の配置や面積,形状といった情報が得られるため、細胞の肥大化 や萎縮といった現象が解析できるようになる. 細胞のセグメンテーションはバイオイメー ジインフォマティクスの中でも長く研究されている課題であり [36],近年は CNN を用 いた方法が多数提案されている [37,38]. なかでも Cellpose [39] は,CNN の一種である U-Net [40] の改良版を,多種多様な環境の細胞画像で構築された大規模なデータセットを 用いて訓練 (最適化) することで、広範な細胞画像に対する高精度なセグメンテーション を実現している.

一方,タイムラプスイメージングで得られる動画像に対する情報解析では,図1.1のよ





#74

#91

図 1.1 細胞追跡の例 (緑色蛍光タンパク質で可視化された好中球の追跡)

うに個々の細胞の移動軌跡を抽出する細胞追跡 (cell tracking) [41,42] が基本的なタスク となっている. 図 1.1 の各図では,それより前のフレームで追跡された移動軌跡を線と番 号 (識別子) で描画している.細胞追跡が抽出する細胞の位置や状態の時系列 (履歴) は, 特に長時間にわたる動態 (細胞の発生から分裂までの状態変化や,環境要因による細胞の 移動傾向の変化等) の解析に有用と期待される.しかしながら,蛍光イメージングデータ は以下に代表される要因から,追跡対象の細胞を見失ったり取り違えたりする追跡誤りが 発生しやすい [21].

撮像過程に起因する要因

ノイズ

微弱な蛍光を増幅して画像化するため,画像内に細胞以外の線維や体毛が発する自家蛍光 (autofluorescence) 等のノイズが多くなりやすい.

低い解像度

空間解像度について,平面方向の解像度は撮像系によって様々であるが,3D イメージングを可能とする2光子励起顕微鏡の場合の深度方向の分解能(撮影 間隔の狭さ)は、異なる深度の焦点面に対し順に断層像 (スライス)を撮影する という手順から、撮影にかかる時間とのトレードオフとなる [43]. そのため、 特に免疫細胞のように急速な動きを伴う細胞のイメージングでは、深度方向の 分解能を小さく抑える (撮影間隔を大きくする)か、撮影範囲を狭くする必要 がある.時間解像度についても十分小さくする、すなわち撮影間隔を大きく取 ることが一般的に求められる. これは長時間にわたる励起光の照射が、細胞内 のタンパク質や核酸、蛍光分子の酸化を進め、蛍光を発する能力を失う光退色 (photobleaching)、細胞周期停止や細胞死といった光毒性 (phototoxicity)を 起こし得る [44] ためである. 従って、免疫細胞のように速い移動を示す細胞 が高密度に分布するようなデータでは、個々の細胞がフレーム間で大きく移動 し、長時間追跡を続けることが難しい場合がある.

観察対象に起因する要因

細胞の密集・重畳

個々の細胞(細胞核等)が蛍光色の塊として可視化されるため,模様や輪郭といったの外観上の特徴に乏しく,個々の細胞を外観で区別することが難しい場合が多い.そうした細胞が密集・重畳する場合,蛍光画像では(特に 2D 画像として可視化した場合)それらの境界が不明瞭となり,単一の細胞と複数の密集した細胞群とを区別することも困難となり得る.

外観の経時変化

顕微鏡によって検出・画像化される蛍光の強度は必ずしも一定していない. そ のため同じ細胞であっても,時刻によって蛍光強度が上下することがあり,画 像上では細胞が一時的に消失したかのように見える場合もある. また,蛍光プ ローブを導入した細胞は状態によって蛍光色や蛍光強度を変化させる. 加え て,形状が不定の細胞も多い. 例えば遊走する免疫細胞は,仮足 (pseudopod) と呼ばれる細胞質の突出を伴って移動することが知られている [45].

分裂や細胞死

細胞分裂や細胞死によって追跡対象が消滅する場合がある.分裂の場合,新た な追跡対象も生じる.

蛍光イメージングデータからの細胞追跡を通じて長期的な細胞動態を解析するには、こう した要因に頑強な、個々の細胞を可能な限り見失ったり取り違えたりせず継続的に追跡す る性能が求められる.これまで開発されてきた細胞追跡手法 [41,42,46-49] は主に特定の 撮像系や細胞種に特化した方法となっており.セグメンテーションにおける Cellpose の ように多種多様なデータを処理できる汎用的な方法は著者の知る限り未だ実現されてい ない.

1.2 研究目的

本研究では、細胞動態のうち細胞周期と細胞遊走に着目し、それぞれの解析のための蛍 光タイムラプスイメージングデータにおける細胞追跡手法を開発する.前節で述べたよう に、蛍光イメージングデータにおける細胞の継続的な追跡は、種々の要因から未だ困難な 課題となっている.本研究で対象とするイメージングデータは、それらの要因のうち「外 観の経時変化」と「細胞の密集・重畳」が特に顕著に発生する例であり、それぞれに頑強 な細胞追跡を目指す.

最初に、細胞周期解析のための蛍光プローブ Fucci を導入した細胞の追跡手法を提案す る.前述のように、Fucci は細胞周期の状態の変化を、赤、黄、緑という蛍光色の変化で 可視化する.本研究では、Fucci 導入細胞の追跡により、抗癌剤の薬効評価や作用機序の 解明につながる細胞周期の時系列解析を可能にすることを目指す.また、蛍光強度の変動 や蛍光色の変化を示す Fucci 導入細胞の追跡を通じて、蛍光イメージングデータにおける 継続的な追跡を難しくし得る「細胞の外観の経時変化」という要因の解決を目指す.

次に、細胞の遊走軌跡解析のための、生体内イメージングデータにおける遊走細胞の追跡手法を提案する.細胞の移動軌跡の時系列解析は、細胞遊走を理解するための基本的な アプローチのひとつである.本研究では、2光子励起顕微鏡で細胞遊走を撮影した生体内 イメージングデータからの細胞追跡により、細胞の遊走軌跡の抽出と時系列解析を可能に することを目指す.また、外観(蛍光色や形状)の類似した細胞の密集・重畳が頻発する 生体内イメージングデータからの細胞追跡を通じて、蛍光イメージングデータにおける継 続的な追跡を難しくし得る「細胞の密集・重畳」という要因の解決を目指す.

1.3 本博士論文の構成

本博士論文は全4章で構成される.

第2章では,Fucci 導入細胞のタイムラプスイメージングで得られる動画像における 細胞追跡について述べる.従来の細胞追跡手法の大部分は,フレーム単位で細胞を検出 し,フレーム間で検出領域を対応付けることで移動軌跡を抽出していた.しかしながら, Fucci 導入細胞はフレームごと・細胞ごとに蛍光強度が大きく変動するため,全フレーム において正確に細胞を検出することが難しく,追跡対象の見失いや取違えが発生しやす かった.そこで本研究では、一時的に追跡対象が隠れる状況 (オクルージョン) に頑強な パーティクルフィルタ法を応用した方法を提案する.提案手法では、状態変化に伴う蛍光 色の変化を捉え続けるため、各フレームにおいて細胞の位置だけでなく状態 (細胞周期の 進行度合い)をも推定する.状態は Fucci によって蛍光色として可視化されるが、変動の 大きい Fucci の蛍光強度 (画像の輝度) そのものではなく、明るさによらない「色味」を 表す色相 (hue) に基づいて状態を推定する.推定された状態から、次フレームとの間で 生じる蛍光色の変化を予測し、次フレームでの追跡対象の検出に用いるモデル (尤度)を 動的に切り替える.提案手法の追跡性能を実際のイメージングデータを用いて定量的に評 価するとともに、追跡結果を細胞周期の時系列解析に適用することで提案手法の有用性を 示す.

第3章では、生体内イメージングで取得されるマルチスライス 3D 動画像における遊走 細胞の追跡について述べる.生体内イメージングデータにおける細胞追跡では、外観が類 似した細胞が密集するため、個々の細胞同士を識別するための画像特徴が有用である.そ のため、高い表現力を有する特徴抽出器を「正解」付きデータ (訓練データ) を用いた訓 練で最適化する深層学習 (deep learning) による方法が有効と期待される.ただし、訓練 データにおける「正解」の作成 (アノテーション) に人力での細胞追跡が必要となるため, マルチスライス 3D 動画像をそのまま扱うとアノテーションコストが膨大であり、実際に は最大値投影法 (maximum intensity projection; MIP) でいったん 2D の動画像に変換 してから訓練・追跡する必要があった. MIP では深度情報が失われるため, 2D 平面上で 密集した細胞や深度方向に重畳した細胞同士が一体として描画されてしまう.そのような 状況では、たとえ深層学習に基づく方法であっても、細胞の取違えや見失いを起こしやす い. そこで本研究では、2D 動画像における深層学習に基づく物体追跡手法を、深層学習 モデルの使い方は変更せずに拡張することで, 2D 動画像で訓練された深層学習モデルを 用いてマルチスライス 3D 動画像内の細胞を追跡する方法を提案する.提案手法の追跡性 能を実際のイメージングデータを用いて定量的に評価するとともに,追跡結果を細胞の移 動速度を用いた遊走軌跡解析に用いることで提案手法の有用性を示す.

最後に第4章で本博士論文を総括し、今後の展望を含む結論を述べる.

第2章 細胞周期解析のための状態変化の予測に基づく 細胞追跡

2.1 緒言

細胞周期 (cell cycle) [2] は細胞が分裂に至るまでの一連の過程であり,細胞の成長 (G1 期), DNA 複製 (S 期), 成長 (G2 期), 分裂 (M 期) の4つの位相に分けられる. 細胞周 期の進行は様々な分子の協調によって厳密に制御されているが, 癌細胞はその機構を無視 して無秩序に分裂・増殖する [2]. 一方, 代謝拮抗剤やトポイソメラーゼ阻害剤等の抗癌 剤は, 細胞周期に特異的に作用 (S 期への進行の阻害, S 期における DNA 複製の阻害等) することで癌細胞の増殖を抑制するという機序が知られている [8].

こうした抗癌剤の薬効や作用機序の解明には,抗癌剤の投与条件によって細胞周期に生 じる差異を時系列解析で抽出することが有用と期待される.例えば多状態イベントヒスト リ解析 (multi-state event-history analysis) [50] は,複数の状態 (イベント) 間を遷移す るサンプルについて状態遷移確率の時系列を推定する統計解析手法であり,細胞周期の進 行を「状態遷移」とみなして適用することで細胞周期の差異を明らかにできると考えら れる.

細胞周期の時系列解析で必要となる細胞周期の履歴 (時系列)を抽出可能とし得る技術 として Fucci (fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator) [14] が知られてい る. Fucci は細胞周期の進行に伴って交互に産生・分解されるタンパク質を,それぞれ異 なる蛍光色の蛍光タンパク質で標識することで,細胞周期の進行を可視化する蛍光プロー ブである. Fucci を導入した細胞は,G1 期において赤色の蛍光,S 期から M 期の分裂前 において緑色の蛍光をそれぞれ細胞核から放出する.従って Fucci 導入細胞のタイムラプ スイメージングにより,細胞ごとの細胞周期の履歴を動画像として記録できる.

タイムラプスイメージングで得られる Fucci 導入細胞の動画像から細胞周期の履歴を抽 出するには,互いに圧し合いながら移動・増殖する細胞の追跡が必要となる.特に,長期 的な細胞周期進行 (例えば細胞の発生から分裂まで)の解析には,個々の細胞を見失った り取り違えたりすることなく,長く継続的に追跡することが求められる.しかしながら, Fucci の蛍光強度は細胞ごと・フレームごとに大きく変動し,さらに細胞周期進行に伴っ て蛍光色が急速に変化する.その結果,従来の細胞追跡手法では個々の細胞を捉え続ける ことが難しく,細胞の見失いや取違えが発生しやすい.

この問題に対し本章では,追跡対象の一時的な隠れ (オクルージョン) に比較的頑強な 追跡手法であるパーティクルフィルタ法を,外観の経時変化を追い続けるように拡張する ことで,Fucci 導入細胞を継続的に追跡する方法を提案する.

本章の以降の部分では,2.2 節で細胞周期と Fucci について説明したのち,2.3 節で Fucci 導入細胞の追跡の意義や波及効果について述べる.2.4 節で従来の細胞追跡手法を 紹介し,Fucci 導入細胞の追跡への適用可能性を議論する.2.5 節では従来手法の問題を 解決する細胞追跡手法を提案する.2.6 節と2.7 節では提案手法を実際の動画像に適用す る.前者では細胞追跡の性能を定量的に評価し,後者では応用例として,追跡で得られる 細胞周期の時系列に多状態イベントヒストリ解析を適用する.最後に2.8 節で本研究を総 括し,今後の展望を述べる.

2.2 細胞周期と Fucci

2.2.1 細胞周期解析の重要性

細胞の増殖は生物の発生と成長,生命機能の維持に必須の現象であり,これが適切に 制御されることで正常な組織や個体が形成・維持される.増殖する細胞は,遺伝情報で ある DNA を複製 (DNA replication)し、2本の DNA を分配するように細胞分裂 (cell division または mitosis)を起こすことで2つの娘細胞 (daughter cell)となる.娘細胞 も同様の過程を繰り返し,次の世代の細胞へと分裂する.このような周期的過程が細胞 周期 (cell cycle) [2] である.細胞周期のうち,DNA 複製は細胞の発生直後ではなく,あ る程度成長が進んだ後に起こることが知られている.また,DNA 複製後にも細胞は成 長を続け,準備が整った後に分裂することが知られている.すなわち,細胞周期は成長, DNA 複製,成長,分裂という4つの位相 (phase)で構成され,それぞれ Gap 1 (G1) 期, Synthesis (S) 期, Gap 2 (G2) 期, Mitosis (M) 期と呼ばれている.

生体における細胞の増殖は、種々の酵素等の協調による細胞周期の進行・停止を通じて 厳密に制御されている.例えば DNA が損傷した細胞があれば、当該細胞の細胞周期を一 時的に停止した上で修復が図られ、修復不可能な場合は細胞死が誘導される.こうした制 御機構は細胞周期チェックポイント (cell cycle checkpoint) [3] と呼ばれ、生体内の細胞 数を適切に保つ、異常な細胞の発生を防止するといった重要な役割を担っている.しかし ながら、突然変位によって遺伝子に異常を来した癌細胞は、無秩序な分裂を繰り返して増 殖することで悪性腫瘍 (癌)を形成する. 癌細胞は細胞周期チェックポイントにおいて細 胞周期の進行・停止を司るシグナル (アクセルやブレーキに例えられる)が異常に亢進ま

たは不活性化しており、その結果として際限ない増殖や形質異常が引き起こされると考え られている [3,51]. 一方、癌の治療に用いられる抗癌剤 (anti-cancer agent)の一部につ いて、細胞周期に特異的に作用するという機序が明らかになってきている.例えば代謝拮 抗剤 (antimetabolite) やトポイソメラーゼ阻害剤 (topoisomerase inhibitor)は、G1 期 から S 期への進行や S 期における DNA 複製を阻害することで、癌細胞の増殖を抑えてい る [8]. こうした抗癌剤の薬効や作用機序の解明には、異なる薬剤の投与条件下における 細胞周期進行の差異を抽出する時系列解析が有用と期待される.

2.2.2 Fucci を用いた細胞周期解析

細胞周期の解析には、典型的にはフローサイトメトリ (flow cytometry) [52] が用いら れてきた.フローサイトメトリでは、多数の細胞を含む試料に蛍光分子を導入し、試料 に含まれる細胞を流体力学的絞り込みによってひとつずつ並べて順に観察する.ヘキス ト染色 (Hoechst staining) やブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine) を用いると DNA が標識されるため、蛍光強度の違いによって DNA 量を推定し、DNA 複製前 (G1 期) の細胞と DNA 複製後 (S 期以降) の細胞を区別できる.しかしながら、フローサイト メトリによる細胞周期解析では細胞の固定 (生化学反応の停止) が必要になるため、各細 胞の瞬間的な位相を知ることは可能であっても、細胞周期が時刻に対しどのように進行し たのか、すなわち経時変化 (時系列) の解明は困難であった.

これに対し、細胞周期の経時変化を可視化するための蛍光プローブ Fucci (fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator) [14] が開発された. Fucci は細胞周期の G1 期 において特異的に蓄積するタンパク質 Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1) を赤色の蛍光タンパク質, S 期以降において特異的に蓄積するタンパク質 Geminin (DNA replication inhibitror) を緑色の蛍光タンパク質でそれぞれ標識する. こ れにより, 図 2.1 上段のように細胞周期の G1 期では赤色の蛍光, S 期以降では緑色の蛍 光をそれぞれ発し, 同図下段のようにマルチカラー画像上では赤 (G1 期), 黄 (S 期初頭), 緑 (S 期以降) という色変化によって細胞周期の進行が可視化される.

Fucci の登場は複数の細胞の細胞周期進行を動画像として記録することを可能にした. 図 2.2 はそうした動画像に含まれるフレームの例であり,高分化型ヒト肝癌由来細胞株 HuH7 に Fucci を導入して観察したものである.左右各図において,共焦点顕微鏡で観 測された Fucci の蛍光がグレースケールの微分干渉顕微鏡像に重ねて描画されている.い ずれの視野にも G1 期の細胞 (赤色),S 期初頭の細胞 (黄色),S-G2 期の細胞 (緑色) が



図 2.1 Fucci による細胞周期進行の可視化 (瀬尾ら [53] の図 1 (b) を改変)



図 2.2 Fucci 導入細胞のイメージングデータの例

同時に存在していることが見てとれる.このようなデータから,細胞ごとの細胞周期の時 系列を追跡を通じて推定することで,細胞周期の時系列解析が可能となる.

2.3 Fucci 導入細胞の追跡の意義

Fucci は幅広い研究に利用されている [54]. オンライン学術データベース Web of Science [55] が公開している引用レポートによると,Fucci の初出論文 [14] の引用数は 2008 年の出版以降徐々に増え続け,2014 年以降 2022 年に至るまでは毎年 100 件以上の 文献に引用されている.応用先も多岐にわたり,抗癌剤や癌治療が癌細胞の細胞周期進行 (各位相の期間) に与える影響 [56–59] だけでなく,幹細胞の分化と細胞周期の位相の関 係 [60,61],生物の発生過程における形態形成と細胞増殖の協調における細胞周期 (の制 御)の役割 [62,63],疾患や薬剤応答による細胞周期の停止や核内倍加 (endoduplication; 細胞が分裂せず,2倍の DNA を有したまま G1 期へ進む現象)といった異常 [64,65] の 解明にも用いられている.現在も細胞周期に関する未解明の課題は残されており [66,67], 今後も Fucci を利用した細胞周期解析が行われ続ける可能性が高い.以上のことから, Fucci 導入細胞の追跡手法の提案により,生命科学や医学,薬学分野における幅広い細胞 周期研究に資すると考えられる.

また,Fucci 以外にも細胞の「状態」に応じて蛍光色を変化させる技術が開発されてい る.Fucci の改良版である Fucci (CA) [68] は,G1 期の初頭から強い赤色蛍光を生じさ せる,S 期と G2 期を異なる蛍光色で可視化する,分裂時に蛍光を消失させないといっ た特長を持つ蛍光プローブである.細胞周期以外にも,細胞内の特定の分子同士の接近 や相互作用を蛍光色の変化によって可視化する FRET (fluorescence resonance energy transfer; 蛍光共鳴エネルギー移動)プローブ [69,70] も知られており,広く生物学研究 に利用されている.また,特定の波長の光を照射することで蛍光色が変化する光変換 (photoconversion)を伴う蛍光タンパク質も開発されている.紫外線を照射することで蛍 光色が緑から赤に変化する Kaede [71] や,紫色と青色の光で緑色蛍光の ON と OFF を 可逆的に切り替えられる Dronpa [72] はその代表例であり,注目する細胞のみを他と異 なる蛍光色で可視化して観察することを可能としている.蛍光色の経時変化を伴う Fucci 導入細胞の追跡手法が実現されると,これら様々な蛍光色の変化を示す細胞の追跡にも応 用できると期待される.

以上のことから, Fucci 導入細胞の追跡手法を開発する意義は大きいと考えられる.

2.4 従来の細胞追跡手法とその問題点

2.4.1 検出と対応付けに基づく方法

従来の細胞追跡手法の多くは、図 2.3 のように最初に全フレームを別々の画像として追 跡対象の細胞を検出し、次に連続するフレーム間で同じ細胞同士を対応付けるという手順 で各細胞の軌跡を構成する.細胞の検出には、図 2.4 のように画像内の各画素を細胞(前 景)領域とそれ以外の背景領域に分類するセグメンテーションが用いられることが多い. 図 2.4 の左図は Fucci の蛍光画像の例であり、緑色蛍光および赤色蛍光が観測できる部分 が細胞(核)領域である.右図では白色で細胞領域、黒色で背景領域を表している.検出 領域同士の対応付けは領域同士の類似性に基づいて行われる.最も単純な手法は距離が最 も近い(位置が最も類似している)領域同士を対応付ける最近傍 (nearest neighbor)法で



図 2.3 検出と対応付けに基づく細胞追跡手法



図 2.4 セグメンテーションの例

あるが,細胞が密集している場合や撮影間隔が大きい場合に異なる細胞同士を対応付けて しまう可能性が高い.そのため領域の色やサイズ,輪郭等の様々な特徴が類似度の計算に 利用されている.

検出と対応付けに基づく細胞追跡手法は広く研究されており、様々な検出のアルゴ リズムや対応付けのアルゴリズムを持つ方法が開発されてきた.代表的な例として LineageTracker [47] が挙げられる.LineageTracker はセグメンテーションによって各フ レームの細胞領域を検出し、各領域について蛍光強度の平均や分散、領域の面積や円形度、 楕円近似による軸長比や軸の傾き等で構成される特徴ベクトルを計算する.その後連続す る2フレーム間で検出領域同士の特徴ベクトルの類似度を計算し、類似度の総和が最大に なるようにハンガリアン法 (Hungarian algorithm) [73] で対応付ける.LineageTracker は画像処理ソフトウェア ImageJ [17] のプラグインとして一般に配布され、広く利用され ている.

検出と対応付けに基づく追跡手法では,各フレームにおける検出の精度が追跡性能に影響する.すなわち,あるフレームにおいて追跡対象の検出に失敗するとその細胞の追跡が 中止されることがある (追跡対象の見失い).そのときに異なる細胞が接近すると,当該細 胞を追跡対象と誤認して追跡が継続される場合もある (追跡対象の取違え). 蛍光イメー ジングでは,常に安定した強度の蛍光が放出されるとは限らず,一時的に蛍光が減衰する



(a) 追跡対象を見失う例

本来の追跡対象



(b) 追跡対象を取り違える例

図 2.5 LineageTracker による追跡失敗例

ことで,画像上では細胞が消失したかのように見えることがある.そうした場合に細胞 を正確に検出することは容易ではなく,追跡対象の見失いや取違えが発生しやすくなる. 本研究で対象とする Fucci 導入細胞も例外ではなく,2.5.3 節で示すように常に蛍光強度 が多様な変動を呈するほか,同じ蛍光色を示す細胞が密集することでその境界が曖昧に なり,追跡誤りを誘発する.実際,前述の LineageTracker で Fucci 導入細胞を追跡する と,検出 (セグメンテーション)の失敗によって図 2.5 (a)のような追跡対象 (38番)の見 失いや,図 2.5 (b)のような近接する異なる細胞との取違え (53番と 21番) が発生する. なお,両図は 2.6 節の実験で用いる Fucci を導入したヒト肝癌由来細胞株 HuH7 の動画 像に LineageTracker の追跡結果を描画したものである.

長期的な細胞周期進行の時系列解析では,Fucci 導入細胞を見失ったり取り違えたりせず継続的に追跡することが重要であり,一時的な蛍光強度の減衰に頑強な追跡手法が求められる.

2.4.2 パーティクルフィルタ法

従来の細胞や物体の追跡手法として,各フレームで独立に追跡対象を検出するのではな く,先頭フレームから順に,対象位置の候補のサンプリングと各候補の対象位置らしさ(尤 度)の算出を通じて逐次的に対象を検出するパーティクルフィルタ (particle filter) [74] に基づく方法 (以下,パーティクルフィルタ法と呼ぶ)も知られている.この方法は一時 的な追跡対象の隠れ (オクルージョン (occlusion))が発生した場合,次以降のフレームに おいて同位置の周辺で対象の検出を試みることができるため,そうした状況に比較的頑強 である [75].従って,蛍光強度の一時的な減衰を伴うイメージングデータからの細胞追跡 にも適すると考えられる.

パーティクルフィルタ法では、入力動画像の各フレーム (*t* 番目とする) において、予め決められた個数 (*n* 個) のパーティクル (particle) と呼ばれる対象位置の候補 $x_t^{(1)}, \dots, x_t^{(n)}$ と、それぞれの追跡対象位置らしさ、すなわち尤度 (likelihood) $l_t^{(1)}, \dots, l_t^{(n)}$ を保持しておく、そして追跡対象の位置 x_t を、尤度で重み付けされたパーティクルの平均位置

$$\boldsymbol{x}_{t} = \frac{1}{L} \sum_{1 \le i \le n} l_{t}^{(i)} \boldsymbol{x}_{t}^{(i)}$$
(2.1)

として推定する.ただし L は尤度の総和

$$L = \sum_{1 \le i' \le n} l_t^{(i')} \tag{2.2}$$

である. パーティクルフィルタ法はベイズ推定に基づく方法で、各パーティクルとその尤度は動画像の t 番目までのフレーム (観測値) の列 Y_t で条件付けられた x_t の事後分布 $p(x_t|Y_t)$ の離散近似となっている.

パーティクルフィルタ法では、最初に先頭フレームにおける対象位置 x_1 を何らかの 方法で検出し、パーティクルを全て同位置に配置する $\left(x_1^{(1)} = \cdots = x_1^{(n)} = x_1\right)$. 続い て、各 t 番目のフレーム $(t \ge 2)$ における対象位置を、図 2.6 に示すように前フレーム におけるパーティクル $x_{t-1}^{(1)}, \cdots, x_{t-1}^{(n)}$ を出発点として予測、尤度計算、再サンプリング (resampling) の 3 ステップで推定する.以下に各ステップの概要を示す.

1. 予測 (パーティクルの散布)

フレーム間での追跡対象の移動を表すモデル $p\left(\boldsymbol{x}_{t}^{(i)} \middle| \boldsymbol{x}_{t-1}^{(i)}\right)$ に従って各パーティク ル $\boldsymbol{x}_{t-1}^{(1)}, \cdots, \boldsymbol{x}_{t-1}^{(n)}$ を移動させ、新しいパーティクル $\boldsymbol{x}_{t}^{(1)}, \cdots, \boldsymbol{x}_{t}^{(n)}$ とする.この モデルはシステムモデル (system model) と呼ばれる.



図 2.6 パーティクルフィルタ法による追跡対象の検出

2. 尤度計算

各パーティクル $s_t^{(i)}$ の尤度 $l_t^{(i)}$ を計算する.

3. 再サンプリング

パーティクル集合 $\left\{ \boldsymbol{x}_{t}^{(1)}, \cdots, \boldsymbol{x}_{t}^{(n)} \right\}$ から、尤度 $l_{t}^{(1)}, \cdots, l_{t}^{(n)}$ に比例する確率に 従って n 個を復元抽出し、あらためて $\boldsymbol{x}_{t}^{(1)}, \cdots, \boldsymbol{x}_{t}^{(n)}$ とおく *1.

パーティクルフィルタ法は、システムモデルと尤度を追跡対象に合わせて任意に設計でき るため、様々な対象に適用しやすい非常に柔軟な方法である.しかしながら、パーティク ルフィルタ法を用いた従来の細胞追跡手法 [77,78] は、追跡対象の外観が動的に変化する ことを考慮しておらず、テンプレート画像との特徴の類似度で尤度を計算している.従っ て、そのままでは蛍光色を動的に変化させる Fucci 導入細胞の継続的な追跡には適さな い.そこで、本研究ではパーティクルフィルタ法における尤度計算の方法を動的に更新す ることで、Fucci 導入細胞を継続的に追跡できる方法を提案する.なお、蛍光色の変化の 影響は蛍光色をグレースケール化することで軽減できると考えられるが、本来であれば蛍 光色が異なる細胞同士の境界までもが曖昧になり、個々の細胞の区別がより難しくなると 考えられる.そのため、本研究ではマルチカラーの蛍光画像をそのまま扱うこととする.

^{*1} つまり、尤度の小さなパーティクルは削除し、尤度の大きなパーティクルは複製する. 再サンプリングを 行わないと、tの増加に伴ってパーティクルの分散が増大することで、大多数のパーティクルの重みはほ とんどゼロで、少数のパーティクルの重みだけが大きいという状況になる. この現象はパーティクルの縮 退 (degeneracy) と呼ばれ、事後分布の近似精度を著しく低下させる [76].

2.5 状態変化の予測に基づく細胞追跡手法 (提案手法)

2.5.1 概要

本研究で提案する方法は、Fucci 導入細胞のタイムラプスイメージングで得られる動画 像 (タイムラプス画像系列)内に出現する細胞を追跡する.入力動画像は N 枚のフレー ム I₁,...,I_N で構成され、各フレームは赤色蛍光を可視化したチャネル (グレースケール 画像)、緑色蛍光を可視化したチャネル、ならびに微分干渉顕微鏡で撮影されたチャネル (DIC チャネル)で構成される.なお、蛍光顕微鏡に微分干渉顕微鏡のユニットを組み込 んだ顕微鏡は商品化・販売されており、蛍光と微分干渉像の同時観測は一般的に行われて いる.入力動画像の例は図 2.2 に示されている.出力は動画像内に出現する各細胞の、各 フレームにおける細胞核の重心位置とする.

本研究で提案するのは、蛍光色の変化する Fucci 導入細胞の継続的な追跡を実現するた めの細胞追跡手法であり、細胞周期進行を考慮して追跡対象を検出するよう、パーティク ルフィルタ法を拡張する.通常のパーティクルフィルタ法は先頭フレームから順に追跡対 象の位置を推定していくが、提案手法では同時に細胞周期の状態、すなわち「G1 期」、「S 期初頭」、「S/G2 期」、「それ以外(蛍光消失)」のいずれかを蛍光色から推定する.sおし て次のフレームでは、前フレームの推定状態から現在の追跡対象の蛍光色を予測し、それ に基づいて追跡対象の検出方法(パーティクルフィルタの尤度関数)を切り替える.この 仕組みにより蛍光色の変化に頑強な Fucci 導入細胞の追跡を目指す.

2.5.2 提案手法

提案手法では,細胞の数だけ用意した追跡器を並列に動作させることで,視野内の複数 の細胞を同時に追跡する.各追跡器は,パーティクルフィルタ法を拡張した方法でそれぞ れの担当する細胞を先頭フレーム *I*₁ から順に検出していく.各追跡器およびそれぞれの 保持する全パーティクルの初期位置,すなわち先頭フレーム *I*₁ における細胞の推定位置 は任意の方法で与えれば良いが,本研究では蛍光チャネルの平滑化^{*2} と 2 値化^{*3} による 簡単なセグメンテーションを用いている.2番目以降の各フレームでは,図 2.7 のフロー

^{*&}lt;sup>2</sup> 与えられた画像について,各画素の輝度をその周辺画素の輝度の重み付き平均等で置換えることでノイズ (画像の高周波成分)を除去し,空間的な輝度変化が滑らかな画像を得る操作.

^{*&}lt;sup>3</sup> 与えられた画像について,各画素を閾値未満か閾値以上かで分類することで,0(ここでは背景領域を表 す)と1(ここでは細胞領域を表す)の2値のみを持つ画像に変換する操作.



図 2.7 提案手法における細胞の検出手順

チャートに示す処理によって追跡中の細胞を検出する.

パーティクルを散布 (図 2.7 の A) する際に用いるシステムモデルには,多数密集した 細胞同士がひしめき合いによって複雑な運動を示すことを想定し,運動の等速性等を仮定 しないランダムウォーク (ブラウン運動) を用いる.すなわち,前フレーム I_{t-1} において 追跡器 c が保持するパーティクル i の位置を $x_{t-1}^{(c,i)}$ とすると,現フレーム I_t ではそのパー ティクルを

$$\boldsymbol{x}_{t}^{(c,i)} = \boldsymbol{x}_{t-1}^{(c,i)} + \boldsymbol{w}_{t-1}^{(c,i)}$$
(2.3)

に移動させる.ただし $w_{t-1}^{(c,i)}$ は平均が零ベクトルの多変量正規分布から生成されるノイズである.

尤度計算 (図 2.7 の B) では, Fucci の色変化を捉え続けるため, 前フレームにおける細胞の状態に応じて尤度関数を動的に切り替える.状態の定義とその推定方法は 2.5.3 節で説明し, それに基づく尤度計算の方法は 2.5.4 節で説明する.

各パーティクルの尤度計算と再サンプリングの後,従来のパーティクルフィルタ法と同様,尤度で重み付けされたパーティクルの平均として,追跡対象の位置 $x_t^{(c)}$ を推定する (図 2.7 の C). 続いて,次のフレームにおける尤度計算に用いるため,推定された細胞位置 $x_t^{(c)}$ における細胞状態を推定する (図 2.7 の D).

本研究が追跡対象とする Fucci 導入細胞は,分裂や細胞死によって消失するため,それ らが起こったときに追跡を中止する必要がある (図 2.7 の E). これらのイベントでは基 本的に細胞が蛍光を放出しない状態となるが,それ以外の場合でも蛍光の変動は大きく, 一時的に蛍光が観測できなくなることも多い.そのため,提案手法は蛍光強度が減衰した 細胞があったとしても,一定フレーム数は追跡を継続し,それでも細胞が検出されない場 合,分裂や細胞死が発生したと判断する.このときの追跡には蛍光色が利用できないの で,尤度計算に例外的な処理 (図 2.7 の F) が必要となる.詳細は 2.5.5 節で説明する.

また,細胞分裂が発生した場合は,母細胞の追跡を中止した後,新たに出現した娘細胞 を検出し追跡を開始する.娘細胞は,先頭フレームで検出された対象を追跡する通常の パーティクルフィルタ法では追跡し得ないため,別の方法で娘細胞を検出し,その次のフ レームからは他の細胞と同様に検出を進める.娘細胞を追跡することで,追跡結果を用い た細胞周期解析に利用できる細胞状態の時系列の数が増えるため,より精緻な解析につな がると考えられる.さらに,幹細胞のように分裂と分化を繰り返す細胞では,母細胞と娘 細胞の間で細胞周期の進行 (G1 期の長さ等)に差異が生じ得ることが明らかになりつつ ある [79-81].こうした現象の解明にも,母細胞に加えて分裂によって生じた娘細胞を追 跡することが有用と考えられる.細胞分裂時の娘細胞の検出処理は 2.5.5.2 節で説明する.

2.5.3 細胞状態の推定

Fucci は図 2.1 で示したように,個々の細胞の細胞周期進行の度合いを,「G1 期」(赤色),「S 期初頭」(黄色),「S-G2 期」(緑色),「M 期または細胞死」(蛍光消失) のいずれかとして可視化する.これら4 値で表現した細胞周期進行の度合いを,ここでは細胞の「状態」と呼び,以下の記号で表現する.



図 2.8 Fucciの蛍光強度の経時変化

- S_{G1}: G1 期 (赤色)
- S_{earlyS}: S 期初期 (黄色)
- S_{S/G2}: S-G2 期 (緑色)
- *S*_{M/D}: M 期または細胞死 (蛍光消失)

次に、蛍光色から細胞の状態を推定する方法を述べる. 蛍光イメージングで取得される のは赤色・緑色それぞれの蛍光強度であるが、Fucciの蛍光強度は図 2.8 に示すように、 細胞間・フレーム間での変動が非常に大きい. 図 2.8 の赤色および緑色の線は、個々の細 胞が発する赤色および緑色の蛍光強度の経時的な変化を表しており、これらは 2.6 節の実 験で用いる実際のデータで観測されるものである. 図 2.8 が示すような変動の多様性か ら、蛍光強度そのもので細胞の状態を推定するのは容易ではないと考え、本研究では色 相 (hue)を用いる. 色相は色の三属性 (色相、彩度 (chroma または saturation)、明度 (brightness, lightness または value))のひとつであり、色味、すなわち明るさ (明度)や 鮮やかさ (彩度)によらない赤、黄、緑といった色の種類を表している. 色相の定義は表 色系によって異なるが、最も一般的な HSV 色空間 (HSV color space)では、色 (*r*,*g*,*b*) (順に赤、緑、青チャネルの輝度を表す)の色相 *h* は次式で定義される.

$$h = \begin{cases} 60 \left(1 + \frac{g - r}{\max(r, g, b) - \min(r, g, b)} \right) & (\min(r, g, b) = b) \\ 60 \left(3 + \frac{b - g}{\max(r, g, b) - \min(r, g, b)} \right) & (\min(r, g, b) = r) \\ 60 \left(5 + \frac{r - b}{\max(r, g, b) - \min(r, g, b)} \right) & (\min(r, g, b) = g) \end{cases}$$
(2.4)

ただし $\min(r, g, b) = \max(r, g, b)$, すなわち r = g = bのときは定義されない. Fucci の 場合は赤色と緑色の蛍光のみが観測されるため,それぞれの蛍光強度を $r \ge g$ として青色



図 2.9 Fucci の色相の変化 (図 2.8 に対応)

チャネルの輝度は0とすると、式2.4は

$$h = 60\left(1 + \frac{g - r}{\max(r, g)}\right) \tag{2.5}$$

と簡略に書ける (r = g = 0のときは定義されない). 式 2.5 で計算される色相 h は,赤色 蛍光のみが放出される (g = 0かつ r > 0) ならば r によらず h = 0であり,緑色蛍光の みが放出される (r = 0かつ g > 0) ならば g によらず h = 120 である.前者は状態 S_{G1} , 後者は $S_{S/G2}$ にそれぞれ近い状況と言えるため,両状態において蛍光強度が変動したと しても色相は比較的安定していると考えられる.実際,図 2.8 の蛍光強度系列を式 2.5 で 色相の系列に変換すると,図 2.9 に示す通りになる.図 2.9 では縦軸目盛りの隣のカラー バーで色相値に対応する色を示している.実際のデータではノイズの影響で赤色または緑 色の蛍光強度が必ずしも0 にはならないこと,また色変化 (細胞周期進行)にかかる時間 は一定でないことから,色相についても多少のばらつきがみられるが,蛍光強度そのもの (図 2.8)と比べると安定しており,状態推定にも利用しやすいと考えられる.

ただし色相は明るさの情報を含まないため,状態 S_{M/D},すなわち細胞分裂や細胞死の 際の蛍光の消失 (減衰) の判定に用いるのは妥当ではない.そのため,蛍光強度そのもの を直接表現する量として,HSV 色空間における明度

$$v = \max(r, g, b) = \max(r, g) \tag{2.6}$$

も補助的に利用する.式 2.6 では式 2.5 と同様に b = 0 とおいている.



図 2.10 色相に基づく状態推定

以上の議論を踏まえ,提案手法は追跡中の細胞の状態*s*を,その位置の色相*h*と*v*を用い,次式の状態推定関数*e*_{state}で推定する.

$$s = e_{\text{state}}(h, v) = \begin{cases} S_{\text{M/D}} & (v \le \tau_{\text{value}}) \\ S_{\text{G1}} & (v > \tau_{\text{value}} \land h < \tau_{\text{G1}}) \\ S_{\text{earlyS}} & (v > \tau_{\text{value}} \land \tau_{\text{G1}} \le h < \tau_{\text{earlyS}}) \\ S_{\text{S/G2}} & (\text{otherwise}) \end{cases}$$
(2.7)

ただし τ_{value} は状態 $S_{\text{M/D}}$ とそれ以外の状態,すなわち蛍光が消失しているか否かを判断するための明度の閾値 (定数) である. $\tau_{\text{G1}}, \tau_{\text{earlyS}}$ は色相の閾値 (定数) で,図 2.10 のように蛍光色の色相から状態 $S_{\text{G1}}, S_{\text{earlyS}}, S_{\text{S/G2}}$ を区別するために用いる.

2.5.4 尤度

提案手法では, 各パーティクルの尤度を,

1. 状態変化 (細胞周期進行)を考慮した尤度を状態推定の結果に基づいて計算する.

2. 他の細胞との取違えを防ぐために尤度を調整する.

の2ステップで計算する.以下,各手順の詳細を述べる.



図 2.11 提案手法の想定する状態変化

2.5.4.1 状態変化を考慮した尤度 提案手法では,Fucci 導入細胞の状態変化が,図 2.11 に示す状態遷移図に従って発生することを想定する.図 2.11 の矢印は,連続した 2 フレームの間で発生し得る状態変化を表している.例えば状態 S_{G1} の細胞は,次のフレー ムにおいても S_{G1} に留まるか,あるいは S_{earlyS} に進むかのいずれかであることを示して いる.提案手法ではパーティクルの尤度を,図 2.11 の状態遷移を仮定したときの,前フ レーム I_{t-1} の細胞位置 $x_{t-1}^{(c)}$ と現フレーム I_t における当該パーティクル i の位置 $x_t^{(c,i)}$ との間で発生した色変化のもっともらしさとして定義する.

図 2.8 および図 2.9 に示したように,Fucci の色相は蛍光強度そのものと比べて変動が 小さい.従って,フレーム間での変化のもっともらしさ (尤度)の計算においても色相の 利用が適すると考えられる.図 2.11 で示したフレーム間で起こり得る状態変化のうち,

- 状態 S_{G1} から S_{G1} または S_{earlyS}
- 状態 S_{earlyS} から S_{earlyS} または S_{S/G2}
- 状態 S_{S/G2} から S_{S/G2}

の各場合における色相変化の幅は、図 2.10 のようにそれぞれ異なる.そこで提案手法では、前フレームにおける状態 s と発生した色相差分 Δh を用いて尤度を定義する.この 尤度を色相差分尤度と呼び、 $f_{hue}(\Delta h \mid s)$ と書く.一方、状態 $S_{S/G2}$ から $S_{M/D}$ への遷移 では蛍光が消失するため、前フレームの状態が $S_{S/G2}$ であった場合は、現フレームの蛍光 強度 (明度) v が小さいほど値が大きくなるような尤度も用いる.これを蛍光消失尤度と 呼び、 $f_{disappear}(v)$ と書く.両者を合わせて、提案手法における状態変化を考慮した尤度 を、次の通りに定義する.

$$f\left(\boldsymbol{x}_{t}^{(c,i)}, I_{t} \middle| \boldsymbol{x}_{t-1}^{(c)}, I_{t-1}\right) = \begin{cases} \alpha f_{\text{hue}}\left(\Delta h_{t} \mid s_{t-1}^{(c)}\right) \\ + (1-\alpha) f_{\text{disappear}}\left(v\left(I_{t}, \boldsymbol{x}_{t}^{(c,i)}\right)\right) & \left(s_{t-1}^{(c)} = S_{\text{S/G2}}\right), \\ f_{\text{hue}}\left(\Delta h_{t} \mid s_{t-1}^{(c)}\right) & (\text{otherwise}) \end{cases}$$
(2.8)

ただし

$$\Delta h_t = h\left(I_t, \boldsymbol{x}_t^{(c,i)}\right) - h\left(I_{t-1}, \boldsymbol{x}_{t-1}^{(c)}\right), \qquad (2.9)$$

$$s_{t-1}^{(c)} = e_{\text{state}} \left(h\left(I_{t-1}, \boldsymbol{x}_{t-1}^{(c)} \right), v\left(I_{t-1}, \boldsymbol{x}_{t-1}^{(c)} \right) \right), \qquad (2.10)$$

 e_{state} は式 2.7 で定義された状態推定関数,h(I, x) と v(I, x) はそれぞれ画像 I の位置 x における色相と明度である. $0 \le \alpha \le 1$ は色相差分尤度と蛍光消失尤度の重み付け定数である.

以下では, 色相差分尤度と蛍光消失尤度の詳細を説明する.

色相差分尤度 図 2.9 に示したように, Fucci の色相は状態 S_{earlyS} では急速に変化し, $S_{\text{G1}}, S_{\text{S/G2}}$ での変化は比較的小さい. このことを踏まえ,提案手法では,状態によって尤 度関数を切り替えて利用する. すなわち,状態 $s \in \{S_{\text{G1}}, S_{\text{earlyS}}, S_{\text{S/G2}}\}$ で条件付けら れた,色相差分 Δh に対する尤度 $f_{\text{hue}}(\Delta h|s)$ を定義する.

色相差分尤度の定義には何らかの数理モデルを用いる方法も考えられるが,本研究では 実際の追跡対象の動画像を用い,次の手順で定義する方法を提案する.

- 1. 動画像の各フレーム I_t $(1 \le t \le N 1)$ について,各画素 x における蛍光色の色 相を $h_t(x)$ とおく.
- 2. 次フレーム I_{t+1} における x の周辺 $\xi_1 \times \xi_2$ 領域の蛍光色の平均色相を $h_{t+1}(x)$ とおく $(\xi_1, \xi_2$ は定数). $\bar{h}_{t+1}(x) h_t(x)$ を色相差分の推定値として計算する.
- 1,2を全てのフレーム番号1≤t≤N−1において、状態がsと推定される全ての 画素 x について繰り返し、色相差分の推定値のヒストグラムを作成する.得られ たヒストグラムを最大値が1となるようにスケールし、色相差分尤度とする.

つまり,図 2.12 のようにあるフレームにおけるひとつの画素に対応する細胞の一部分が, 次フレームでは細胞の移動を経て周辺 $\xi_1 \times \xi_2$ 領域に存在すると想定し,その領域内の平 均色相を次フレームの色相推定値とする.そして元の画素の色相との間の色相差分を計算 することで,その画素での色相差分を推定する.この方法で計算される色相差分は大まか な推定値ではあるが,人力での尤度設計,すなわち試行錯誤によるモデルの選択やパラ メータの調整が不要である点は重要な利点と考えられる.

以上の方法で定義される色相差分尤度の例を図 2.13 に示す. 図 2.13 は本研究の実験 で用いるデータの一部に上の方法を適用して得られる色相差分尤度である. 前の状態が S_{G1} や S_{S/G2} のときには色相差分は小さく, S_{earlyS} のときには色相差分が大きくなると いう, 直観に反しない尤度の定義が得られている.



図 2.12 色相差分尤度の定義のための色相差分の推定



図 2.13 色相差分尤度の例

蛍光消失尤度 与えられた明度 *v* に対し, 蛍光消失の可能性を表す蛍光消失尤度には, *v* がある程度低い場合には 1 に近い値, そうでない場合には *v* が大きくなるにつれて 0 に 近づくような関数を利用すればよい. そこで,次式および図 2.14 の形で表されるシグモ イド型の尤度関数で蛍光消失尤度を定義する.

$$f_{\rm disappear}(v) = \frac{1}{1 + \exp(v - \psi)},$$
 (2.11)

ただし定数 ψ は図 2.14 で点線で示しているように,変曲点 (蛍光消失尤度が 0.5 になる 点) における明度である.



図 2.14 蛍光消失尤度 ($\psi = 10$)

2.5.4.2 他の細胞との取違えを防ぐための尤度調整 提案手法では,追跡器がパーティ クルを散布する際,近接する追跡対象以外の細胞の領域にパーティクルが配置される場合 がある.そうしたパーティクルの尤度が十分高いと,追跡器が異なる細胞を追跡対象と誤 認する(追跡対象の取違え)原因となる.そこで提案手法では,追跡対象以外の細胞領域 に配置されたパーティクルの尤度を小さくすることで,追跡対象の取違えを防止する.す なわち,動作中の追跡器同士の間に境界線を設け,境界線を越えて散布されたパーティク ルの尤度はゼロ,境界線を越えないパーティクルは境界線に近付くにつれて値が小さくな るように尤度を調整する.具体的な手順は次の通りである.

- 1. 前フレーム I_{t-1} における全ての追跡器の位置 $x_{t-1}^{(c')}$ ($c' \in C_t$, C_t は現フレーム I_t において細胞を追跡している追跡器の集合)を母点とするボロノイ分割で,画像全 体を各追跡器 $c' \in C_t$ が存在する領域 $R_{c'}$ に分割する.
- 各追跡器 c の保持するパーティクルのうち、自身の領域 R_c の外にあるものの尤度 を 0 とする.
- 3. R_c 内の各パーティクル *i* について,最も近い領域境界線上の最も近い点までの距離 d_{border} と、追跡器の位置 $\boldsymbol{x}_{t-1}^{(c)}$ までの距離 d_{self} との比を

$$r_{\rm dist} = \frac{d_{\rm border}}{d_{\rm self}} \tag{2.12}$$


図 2.15 追跡器同士の追跡対象の取違えを防ぐための尤度調整因子 ($\beta = 1, \gamma = 0.001$, 画像のサイズは 128 × 128)

で計算する.これを用いて、パーティクル i に対する尤度調整因子

$$\zeta = \min(\max(\beta r_{\text{dist}} - \gamma, 0), 1) = \begin{cases} 0 & \left(r_{\text{dist}} \le \frac{\gamma}{\beta}\right) \\ \beta r_{\text{dist}} - \gamma & \left(\frac{\gamma}{\beta} < r_{\text{dist}} \le \frac{\gamma+1}{\beta}\right) \\ 1 & (\text{otherwise}) \end{cases}$$
(2.13)

を計算し、当該パーティクルの尤度(式 2.8)に乗算する.

 β, γ はいずれも非負定数である.式 2.13 で定められる尤度調整因子 ζ は、パーティ クルの位置が境界線に近い (距離が γ/β 以内である)場合には 0 で、位置が内側に近 づくにつれて線形に増大し、境界線からの距離が $(\gamma + 1)/\beta$ 以上で 1 となる。例えば $\beta = 1, \gamma = 0.001$,追跡器数 2 のときの尤度調整因子の大きさを可視化すると、図 2.15 に示す通りになる。図 2.15 の × 印は追跡器の位置、白線は領域の境界線である。左側の 追跡器のパーティクルに対する尤度調整因子は緑色、右側の追跡器のパーティクルに対す る尤度調整因子は赤色で描画され、各色の輝度 (濃度)が値の大きさを表している。

2.5.5 蛍光減衰時の追跡

提案手法では蛍光減衰時, すなわち前フレームにおける追跡中の細胞の状態が S_{M/D} で あった場合, 以下の手順で追跡の継続または娘細胞の追跡を試みる.

- 1. t_{M/D} フレームは再検出を試みる. この間に状態が S_{M/D} 以外の細胞が検出できれ ば一時的な蛍光減衰と判断し,その細胞の追跡を再開する.
- 2. t_{M/D} フレームの間に再検出が成功しなければ、細胞分裂または細胞死と判断する.





(a) 元画像

(b) 抽出結果 (白が細胞領域, 黒が背景領域)

図 2.16 DIC チャネルからの細胞領域の抽出 (セグメンテーション)

その細胞の追跡は終了し,娘細胞を探索する.娘細胞が見つかれば,それらの追跡 を開始する.

t_{M/D} は定数である.手順2で細胞分裂または細胞死と判定された場合に娘細胞の検出を 一定フレーム数繰り返すのは,図2.1のように分裂の直後はG1期であっても赤色蛍光の 強度が弱く,検出に失敗しやすいと考えられるからである.以下では2.5.5.1節で蛍光が 減衰している細胞の再検出方法を説明したのち,2.5.5.2節で細胞分裂と判定された場合 の娘細胞の検出と追跡のための方法を説明する.

2.5.5.1 蛍光減衰時の再検出 蛍光減衰中は細胞領域とそれ以外の領域を蛍光で区別で きないため,図 2.16 のように DIC チャネルから細胞領域を抽出し,細胞領域外のパー ティクルの尤度をゼロとすることで,追跡器が細胞外の位置を探索することを防ぐ.細胞 領域の抽出には任意のセグメンテーション手法が利用できるが,本研究では Sobel フィル タ [82] で細胞の輪郭を検出し,輪郭で囲まれた領域を細胞領域として抽出する簡単な方 法を用いている.

また,状態 S_{M/D} 以外の追跡されていない細胞が周囲に見つかれば (パーティクルとしてサンプリングされれば),追跡対象細胞を再び捉えた可能性があるため,当該パーティクルの尤度を大きな値とし,次フレームからその細胞が追跡されるようにする.

以上のことを踏まえ,蛍光減衰時にはフレーム I の位置 x にあるパーティクルの尤度 $f_{M/D}(x, I)$ を次式で計算する.

$$f_{\rm M/D}\left(\boldsymbol{x}, I\right) = \pi_{\rm fore}\left(\boldsymbol{x}, I\right) \cdot \pi_{\rm fluor}\left(\boldsymbol{x}, I\right), \qquad (2.14)$$

ただし

$$\pi_{\text{fore}}(\boldsymbol{x}, I) = \begin{cases} 1 & (位置 \, \boldsymbol{x} \, \& \, \forall \, \nabla \, \boldsymbol{\nu} - \Delta \, I \, \mathcal{O} \, \& n \, b \, \& \, \exists \, \boldsymbol{\psi} \, b \, \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases}, \quad (2.15)$$

$$\pi_{\text{fluor}}(\boldsymbol{x}, I) = \begin{cases} 1 - \omega & (e_{\text{state}}\left(h(I, \boldsymbol{x}), v(I, \boldsymbol{x})\right) = S_{\text{M/D}})\\ \omega & (\text{otherwise}) \end{cases}, \quad (2.16)$$

 $0 < \omega \le 0.5$ は定数である. π_{fore} は細胞領域以外のパーティクルの尤度をゼロにする因子, π_{fluor} は再び蛍光が観測されるようになった細胞を捉えるための因子である.

2.5.5.2 娘細胞の検出 細胞分裂と判断された細胞の娘細胞は、その周辺の $\nu_1 \times \nu_2$ 領域から探索する.娘細胞の状態は S_{G1} であるから、状態推定関数 e_{state} を用いて、娘細胞の候補となる細胞領域が抽出できる.それら候補細胞のうち、他の追跡器の追跡対象でないものが 2 個以上あれば、母細胞の位置に最も近い 2 個を娘細胞と判定し、次フレームからそれらを追跡する.

2.6 評価実験

提案手法の性能を定量的に評価するため,提案手法を実際のイメージングデータに適用 し,追跡結果を正解(人力での追跡結果)と比較する実験を行った.

2.6.1 実験方法

2.6.1.1 イメージングデータ 高分化型ヒト肝癌由来細胞株 (human hepatocellular carcinoma cell line) HuH7 [6] のタイムラプスイメージングで得られた動画像を利用した. 各動画像は,共焦点顕微鏡で撮影された赤色蛍光チャネルと緑色蛍光チャネル,ならびに微分干渉顕微鏡で撮影された DIC チャネルの 3 チャネルで構成され, 30 分おきに 150 フレーム (約 3 日間) ずつ取得されている. 蛍光チャネルの解像度は赤色・緑色とも に 1,024 × 1,024 で,各画素の色深度は 12bit (4,096 階調) である. 動画像は 2 本用いて おり,以下ではそれぞれを動画像 A,動画像 B と呼ぶ. 動画像 A はコントロール (薬剤 投与なし)の条件下で撮影され,動画像 B は抗癌剤として肝癌の化学療法に利用される代 謝拮抗剤 5-FU (fluoprouracil) を投与した条件下で撮影されている. 各動画像のフレームの一部は図 2.2 に示されており,左側が動画像 A,右側が動画像 B である.

2.6.1.2 追跡手法 提案手法の性能を、従来手法である LineageTracker と比較した. LineageTracker は 2.4.1 節で紹介したように検出と対応付けに基づく細胞追跡手法のひと つであり,画像処理ソフトウェア ImageJ [17] のプラグインとして広く利用されている.

2.6.1.3 実装 提案手法は Python 言語および OpenCV ライブラリを用いて実装した. 各種パラメータのうち状態推定関数 e_{state} (式 2.7) で用いる色相閾値 $\tau_{G1}, \tau_{\text{earlyS}}$ は,入 力動画像ごとに,全フレーム・全画素における蛍光の色相の,最小値と最大値の間の第1 五分位点と第4五分位点にそれぞれ設定した.その他のパラメータは人力で調整し,全て の動画像に対して同一の設定とした.

従来手法 LineageTracker は画像処理ソフトウェア ImageJ のプラグインとして一般に 配布されている実装 [47] を使用した.各種パラメータは可能な限り良い性能を発揮する ように人力で調整した.

2.6.1.4 評価指標 定量的評価には,物体や細胞の追跡性能の評価に一般的に利用され ている CLEAR 指標 (CLEAR multi-object tracking metrics) [83] を利用した. CLEAR 指標は 2007 年開催のワークショップ CLEAR (classification of events, activities, and relationships) [84] で提案された物体追跡の評価指標群である.

複数の対象の追跡性能を評価するには,追跡で得られた軌跡(仮説軌跡と呼ぶ)と正解 軌跡のマッチング,すなわち追跡結果の各軌跡が正解におけるどの対象を追跡しているか の解釈が必要となる. CLEAR 指標ではフレームごとに仮説軌跡と正解軌跡をマッチさせ る.すなわち,仮説軌跡と正解軌跡が一対一に対応するのではなく,ある仮説軌跡に対応 する正解軌跡がフレームによって変化し得る.さらに,各正解軌跡に対して仮説軌跡を可 能な限り長く対応付ける,すなわち対応する仮説軌跡の入れ替わりができるだけ起きない ようにマッチさせることも目標となっている.具体的には,先頭フレームから順に,次の 規則に従って仮説軌跡と正解軌跡のマッチングを求める.

- 1. 前フレーム I_{t-1} において正解軌跡 O と仮説軌跡 \mathcal{H} が対応付けられていて,現フ レーム I_t において O と \mathcal{H} の距離が閾値以下であるならば,より O に近い他の仮 説軌跡が存在するとしても,現フレーム I_t において O と \mathcal{H} をマッチさせる.
- 1. が完了した後に残っている正解軌跡および仮説軌跡の間で一対一のマッチン グを求める.ここでは、距離が閾値を超えないような正解軌跡と仮説軌跡のペア について、マッチしたペアの間の距離の総和が最小になるような最適化を行う. これは割当問題 (assignment problem) と呼ばれる組合せ最適化問題の一種とみ なせるため、ハンガリアン法 [73] によって多項式時間で解くことができる.この

手順で仮説軌跡とマッチしなかった正解軌跡はフレーム I_t における未検出 (false negative),正解軌跡とマッチしなかった仮説軌跡はフレーム I_t における誤検出 (false positive) として計上する.

正解軌跡と仮説軌跡のマッチングに基づき,種々の指標が定義される.まず,仮説軌跡 が各フレームにおいてどの程度正確に細胞を検出しているかを表す指標を挙げる.

TP (true positive; 真陽性)

正解軌跡と仮説軌跡のマッチ,すなわち正しい検出の総数であり,良い追跡結果に おいて大きな値をとる.

FN (false negative; 偽陰性)

仮説軌跡とのマッチがない正解軌跡の点,すなわち未検出の総数であり,良い追跡 結果において小さな (0 に近い) 値をとる.

FP (false positive; 偽陽性)

正解軌跡とのマッチがない仮説軌跡の点,すなわち誤検出の総数であり,良い追跡 結果において小さな (0 に近い) 値をとる.

Prec (precision; 適合率)

全ての仮説軌跡のうち正解軌跡とマッチしている,すなわちいずれかの追跡対象を 捉えている点の割合であり,

$$Prec = \frac{TP}{TP + FP}$$
(2.17)

で定義される. 良い追跡結果において大きな (1 に近い) 値をとる.

Rec (recall; 再現率)

全ての正解軌跡のうち仮説軌跡とマッチしている,すなわち検出されている点の割 合であり,

$$Rec = \frac{TP}{TP + FN}$$
(2.18)

で定義される. 良い追跡結果において大きな (1 に近い) 値をとる.

MOTP (multiple object tracking precision)

仮説軌跡の空間的な正確さ(推定された位置と正解との近さ)を表す評価指標で あり、

$$MOTP = \frac{\sum_{\mathcal{H},t} d_{\mathcal{H},t}}{\sum_{t} TP_{t}}$$
(2.19)

で定義される. ここで $d_{\mathcal{H},t}$ は仮説軌跡 \mathcal{H} と対応する正解軌跡とのフレーム I_t に

おける距離 (対応する正解軌跡がない場合は 0), TP_t はフレーム I_t における TP, すなわち仮説軌跡と正解軌跡の対応の総数である. すなわち MOTP は仮説軌跡 と正解軌跡の間の平均距離を表し,良い追跡結果において小さな (0 に近い) 値を とる.

また、追跡に関する性能として以下の3指標が定義される.

IDSW (number of ID switches; ID スイッチ回数)

正解軌跡とマッチする仮説軌跡が変化する (同じ対象が異なる仮説に追跡されるようになる) 回数の総計であり,良い追跡結果において小さな (0 に近い) 値をとる.

Frag (number of fragmentation; 断片化回数)

正解軌跡とマッチする仮説軌跡がなくなる (追跡されている状態から未検出に移行 する)回数の総計であり、良い追跡結果において小さな (0 に近い) 値をとる.

MOTA (multiple object tracking accuracy)

追跡性能の総合的な評価指標であり,全正解軌跡に含まれるフレーム数の総計 N_{GT}を用いて、

$$MOTA = 1 - \frac{FP + FN + IDSW}{N_{GT}}$$
(2.20)

で定義される. 良い追跡結果において大きい (1 に近い) 値をとる.

IDSW と Frag はそれぞれ追跡対象の取違えと見失いの回数を表しており,継続的追跡の 能力を評価するのに有用である.以上の指標を総称して CLEAR 指標と呼ぶ.

さらに,継続的に追跡された正解軌跡がどの程度あり,また仮説軌跡がどの程度継続的 な追跡に成功しているか評価するため,本実験では次の指標も利用した.

MTC (mostly-tracked cells)

正解軌跡のうち,その長さの少なくとも 80 % のフレーム数において同じ対象とし て追跡された (同じ仮説軌跡に対応付いた) 軌跡の割合であり,良い結果において 大きな (1 に近い) 値をとる.

MTH (mostly-tracking hypotheses)

仮説軌跡のうち,ある正解軌跡をその長さの 80 % 以上のフレーム数において追跡 した軌跡の割合であり,良い結果において大きな (1 に近い) 値をとる.

MLC (mostly-lost cells)

正解軌跡のうち,その長さの20%未満のフレーム数でしか同じ対象として追跡さ

れなかった (同じ仮説軌跡に対応付かなかった) 軌跡の割合であり,良い結果にお いて小さな (0 に近い) 値をとる.

MLH (mostly-lost hypotheses) 仮説軌跡のうち,全ての正解軌跡をその長さの 20 % 未満のフレーム数でしか追跡できなかった軌跡の割合であり,良い結果において小さな (0 に近い) 値をとる.

MTC と MTH は, 正解軌跡をその長さの 80 % 以上で同じ細胞として追跡することを 「正解」とした上での再現率 (recall) と適合率 (precision) に相当する. MLC と MLH は, 正解軌跡をその長さの 20 % 未満でしか同じ細胞として追跡できないことを「失敗」 とした上での,追跡に失敗した正解軌跡と仮説軌跡のそれぞれの割合を表す. なお,これ らの4指標は CLEAR 指標より古くから知られていた指標である MT (mostly-tracked) と ML (mostly-lost) [85] に着想を得たものである. MT は「正解軌跡のうちその長さの 80 % 以上のフレーム数が追跡されたものの割合」,ML は「正解軌跡のうちその長さの 20 % 未満のフレーム数が追跡されたものの割合」であるが,同じ細胞として追跡されて いるか否か (仮説軌跡のスイッチの有無)を考慮しておらず,継続的な追跡の評価として は不十分と考えたため,本研究では新たに MTC, MTH, MLC, MLH を定めて利用した.

本実験では、以上の各種指標を Python 言語の py-motmetrics ライブラリ [86] を用い て計算した.正解軌跡と仮説軌跡をマッチさせるか否かの基準となる距離の閾値は、本実 験で扱ったデータにおける Fucci 導入細胞の大きさがおよそ 40 画素四方であることを踏 まえ、その半分の 20 画素に設定した.

2.6.2 結果

2.6.2.1 定量的評価 動画像 A, B に対し各手法を適用し,前節で導入した評価指標 を計算した結果をそれぞれ表 2.1,表 2.2 に示す.両表において上矢印↑は値が大きいほ ど良い指標を,下矢印↓は値が小さいほど良い指標をそれぞれ表す.各指標において最 も良い結果は太字で強調している.細胞の検出性能に関係する TP, FP, FN, Prec, Rec, MOTP については,提案手法と従来手法の差が僅かである場合や,従来手法の方が優位 である場合が見受けられる.この点については 2.6.3 節で考察する.一方で,細胞の継続 追跡に関する性能を示す IDSW, Frag, MTC, MTH, MLC, MLH については,両方の データにおいて提案手法が優位な結果を示している.特に IDSW と Frag の改善は,追跡 対象の取違えや見失いが少なくなったことを表しており,継続的に追跡できた細胞や仮説 軌跡の割合を表す MTC, MTH, MLC, MLH の改善とあわせて提案手法が Fucci 導入細

	$\mathrm{TP}\uparrow$	$\mathrm{FP}\downarrow$	$\mathrm{FN}\downarrow$	$\operatorname{Prec} \uparrow$	$\mathrm{Rec}\uparrow$	$\mathrm{MOTP}\downarrow$	$\text{IDSW}\downarrow$
提案手法	$5,\!499$	175	4,161	0.969	0.569	3.143	31
LineageTracker	4,771	0	4,889	1.000	0.494	1.248	121
	Frag	↓ MC	DTA \uparrow	$\mathrm{MTC}\uparrow$	$\mathrm{MTH}\uparrow$	$\mathrm{MLC}\downarrow$	$\mathrm{MLH}\downarrow$
提案手法	20	6	0.548	0.515	0.383	0.124	0.336
LineageTracke	r 12	1	0.481	0.189	0.086	0.167	0.545
表 2.2 動画像 B の追跡結果の評価							
	$\mathrm{TP}\uparrow$	$\mathrm{FP}\downarrow$	$\mathrm{FN}\downarrow$	$\operatorname{Prec} \uparrow$	$\mathrm{Rec}\uparrow$	$\mathrm{MOTP}\downarrow$	$\mathrm{IDSW}\downarrow$
提案手法	5,746	422	4,464	0.932	0.563	3.275	15
LineageTracker	5,721	2	4,489	1.000	0.560	1.093	116
	Frag	↓ MC	DTA \uparrow	$\mathrm{MTC}\uparrow$	$\mathrm{MTH}\uparrow$	$\mathrm{MLC}\downarrow$	$\mathrm{MLH}\downarrow$
提案手法	1	6	0.520	0.614	0.470	0.145	0.340
LineageTracke	r 11	9	0.549	0.279	0.124	0.198	0.601

表 2.1 動画像 A の追跡結果の評価

胞をより継続的に追跡できることを示唆している.

2.6.2.2 追跡結果例 提案手法による追跡が成功している例を図 2.17, 2.18 に示す. 両図では追跡済みの軌跡を線と番号 (識別子) で描画している. 図 2.17 においては (a) の 38 番, (b) の 19 番の細胞の蛍光強度が S 期初頭の色変化時に減衰している. その際, LineageTracker (図 2.17 (a)) では当該細胞の検出 (セグメンテーション) に失敗して追 跡結果の軌跡が分断されているが,提案手法 (図 2.17 (b)) では継続して追跡することに 成功している. 図 2.18 においては (a) の 21 番, (b) の 17 番の細胞の蛍光強度が S-G2 期で一時的に減衰している. その際, LineageTracker (図 2.18 (a)) は当該細胞の検出に 失敗し,その後 53 番 (図 2.18 (b) では 15 番) の細胞との取違えが発生しているが,提案 手法 (図 2.18 (b)) ではいずれの細胞とも継続して追跡できている. また図 2.17 (b) およ び図 2.18 (b) では,追跡中に推定された状態に応じて異なる色で軌跡を描画しているが, 両図ともにいくつかの軌跡は複数の色で描かれている. それらは追跡対象の外観の変化を 考慮しない通常のパーティクルフィルタ法では難しかった,蛍光色の変化を経て細胞を追



(a) LineageTracker の追跡結果



(b) 提案手法の追跡結果

図 2.17 提案手法による追跡成功例 1 (動画像 B の一部)

跡し続けることに成功している例である.

次に,提案手法が追跡に失敗している例を図 2.19 に示す.図 2.19 は,追跡器が追跡対象と未追跡細胞 (どの追跡器にも追跡されていない細胞)を取り違える例である.提案手法は主に色変化の自然さによって追跡対象を識別しているため,類似した色変化を示すの未追跡細胞が近接すると対象の取違えを起こす場合がある.

2.6.3 考察

表 2.1 と表 2.2 で示したように,提案手法は継続的な追跡に関する指標 IDSW, Frag, MTC, MTH, MLC, MLH について従来手法を上回る性能を達成した.また,追跡結果 には図 2.17 (b) や図 2.18 (b) のように,状態変化を経てなお正しく追跡を続けている軌 跡が多数含まれていた.これに対し従来手法 LineageTracker は,図 2.5 のように,一時 的な蛍光の減衰や蛍光色の変化の際の検出漏れにより,追跡結果の軌跡が分断される例が 散見された.従って提案手法は追跡対象の状態を推定して細胞の探し方,すなわち尤度を 切り替えることで蛍光強度の変動や急速な色変化を伴う Fucci 導入細胞をより継続的に追



本来の追跡対象

検出の失敗

(a) LineageTracker の追跡結果



(b) 提案手法の追跡結果

図 2.18 提案手法による追跡成功例 2 (動画像 A の一部)



図 2.19 提案手法による追跡失敗例(追跡中の細胞と近接する未追跡細胞との取違え)

跡できたと言える.

提案手法の FP (誤検出数) と Prec は従来手法 LineageTracker を下回る結果となっ た. 原因は主に、複数の追跡器が1つの細胞を複数の細胞と誤認して追跡を進めたこと、 すなわち追跡器の「衝突」であると考えている.特に細胞分裂時の娘細胞の検出において, 蛍光強度の空間的なばらつきによって既に追跡されている状態 SG1 の細胞の一部分が異 なる細胞と誤認されたり、娘細胞の一方が2つの異なる細胞と誤認されたりしていること を確認した.このような誤りは一度発生すると、異なる追跡器の対象同士を区別するため の仕組み (2.5.4.2 節)の効果も得られず、その後も1つの細胞を複数の追跡器で追跡する ことになり、片方の追跡器の結果は全て誤検出として計上される.これにより FP が増大 したとともに、式 2.17 の通り FP を用いて計算される Prec も悪化したと考えられる.

提案手法は入力動画像の先頭フレームで検出された細胞の位置を始点として追跡を進め ている.従って,先頭フレームにおいて視野内に存在せず,2番目以降のフレームで視野 外から進入する細胞は追跡できない.また,先頭フレームにおいて視野内に存在する細胞 であっても,検出漏れとなった細胞は追跡できない.提案手法の初期フレームにおける細 胞検出には任意の方法を用いることができるが,特にG1期初頭やS期初頭の細胞は蛍光 が弱いため,検出漏れが起こりやすい.このような未検出の細胞の存在は,追跡によって 抽出できる細胞周期進行の系列数を減少させるだけでなく,図2.19のように追跡中の細 胞に近接することで,当該細胞の追跡器に未追跡細胞を追跡対象と誤認(取違え)させる 原因ともなり得る.提案手法は追跡されている細胞との取違えを防ぐ仕組みを有するが, 未追跡細胞との混同には対処できないためである.特に,追跡対象の視野外への退出や蛍 光の減衰が発生した場合,追跡器は一定フレーム数追跡対象を探索するが(2.5.5節),そ の間に未追跡細胞が接近すると,追跡器が未追跡細胞を追跡対象と誤認する(取違え)可 能性がある.この点の改善には,先頭フレーム以外でも細胞を検出し,既に追跡済みの細 胞ではないものを選んだ上で追跡するような,視野内の全ての細胞を追跡する仕組みが有 用と考えられる.

本研究では,追跡対象の細胞周期が図 2.11 のように正常に進行し,Fucci の蛍光色が 図 2.1 のように正常に変化することを想定しているが,そうでない細胞の存在は考慮し ていない.例えば M 期まで進行した細胞が分裂せず,複製された DNA を保持したまま G1 期に移行して細胞周期を繰り返す核内倍加 [87] という現象が知られている.本実験で 扱った動画像 B にも核内倍加を示す細胞が存在したが,提案手法による追跡結果では,M 期から G1 期へ移行する際に蛍光減衰によって分裂または細胞死と判定されており,それ より後の追跡に失敗していた.また,投与する抗癌剤の種類によっては細胞死が G1 期等 でも起こり得る [88].提案手法ではそのような状態変化を想定していないため,追跡器は 細胞死の後も周辺を探索し続け,周囲に細胞死の直前と同じ状態の未追跡細胞が見つかれ ばその細胞を追跡対象と誤認して追跡を続ける可能性が高い.細胞周期研究では,こうし た細胞周期の異常も重要な研究対象となっている [64,65] ため,提案手法を実用問題に応

37

用するには,異常な細胞周期進行を示す細胞の追跡が課題のひとつとして挙げられる.こ の課題を解決する方法として,DIC チャネルの画像特徴など,蛍光以外の情報を積極的に 利用することが考えられる.

2.7 提案手法を用いた細胞周期解析

提案手法の細胞周期解析への応用可能性を検討するため、細胞周期の時系列解析の一例 として、細胞追跡によって位置と同時に得られる細胞ごとの状態の時系列に多状態イベン トヒストリ解析 [50] を適用した.

イベントヒストリ解析 [89] はある時点 (製品の製造,患者への治療の開始等) から何 らかのイベント (製品の故障,患者の死亡または回復) が発生するまでにかかる時間の データを統計的に解析する方法論であり,生存時間解析 (survival analysis) や TTE 解 析 (time-to-event analysis) とも呼ばれる. イベントヒストリ解析における主な推定の対 象は,各時刻におけるイベントが未だ発生していない確率 (生存率) である.多状態イベ ントヒストリ解析は,イベントヒストリ解析をサンプルが複数の状態 (イベント) 間を遷 移するようなデータに拡張 (一般化) した方法論であり,各時刻においてサンプルが各状 態に滞在している確率,すなわち状態占有確率 (state occupation probability) が主な推 定対象となる.また,多状態イベントヒストリ解析の重要な特長として,観察の打切り (censoring),すなわちイベント (状態遷移) が起こる前に観察が終了したサンプルを含む データを扱える点が挙げられる.打切りサンプルを含むデータを扱う場合,打切りは状態 遷移 (状態占有確率) に影響を与えないと仮定して,打切り以前の情報からデータ全体の 状態占有確率を推定する.

本解析では,提案手法による追跡結果を用いて,状態 *S*_{G1}, *S*_{earlyS}, *S*_{S/G2} のそれぞれ の状態占有確率の経時変化を多状態イベントヒストリ解析で推定した.これにより,実験 条件間で生じる細胞周期進行の差異を抽出することを目指した.細胞追跡によって得られ る細胞周期の時系列は動画像の最終フレームで終了するが,実際はその後も細胞周期が進 むため,最終フレームまで追跡した細胞を打切りサンプルとして扱った.

まず, Fucci を導入した HuH7 細胞のタイムラプスイメージングで得られた動画像 40 本に提案手法を適用し,各細胞の状態の時系列を抽出した.動画像の内訳は次の通りで ある.

- 動画像 1-10: コントロール (薬剤投与なし)
- 動画像 11-20: 5-FU を 10mg 投与



図 2.20 多状態イベントヒストリ解析による各状態の状態占有確率の推定

- 動画像 21-30: インターフェロン α (interferon-α; IFN-α) を 1,000mg 投与
- 動画像 31–40: 5-FU を 10mg, IFN-α を 1,000mg 投与

IFN-α は抗癌剤として臨床利用されているタンパク質である.また,フレーム数や撮影 間隔,解像度,色深度は 2.6 節の実験と同様である.

次に,得られた状態の時系列に多状態イベントヒストリ解析を適用した.多状態イベ ントヒストリ解析の実装には R 言語と msSurv パッケージ [90] を用いた.結果として, 図 2.20 に示す状態占有確率の時系列が推定された.図 2.20 の 3 つのカラムは左から状態 S_{G1}, S_{earlyS}, S_{S/G2} についてのグラフである.各折れ線グラフが状態占有確率の推定値 を表しており,その上下に薄い色の帯で 95 % 信頼区間が示されている.

図 2.20 では、特に状態 S_{G1} の状態占有確率において条件間に顕著な差が現れており、 IFN- α の投与および 5-FU と IFN- α の併用により S 期への進行が阻害されていることが 示唆される. このような現象は G0/G1 期停止 (G0/G1 arrest) と呼ばれており、癌細胞 の増殖を抑えるメカニズムになり得る. なお、IFN- α が G0/G1 期停止を引き起こすとい う結果は既に報告されている [58]. また、5-FU と IFN- α の併用については肝癌の治療法 としての奏功が報告されており [8,91,92]、癌細胞の増殖を抑制するという結果も報告さ れている [93]. 従って本解析の結果は既に知られている結果と矛盾しておらず、提案手法 が妥当な解析結果を産出するのに十分な性能を有することが示唆される.

図 2.20 に出現している実験条件による差は比較的小さなものであるが,それゆえに目 視等で抽出することは難しい.従って,提案手法と多状態イベントヒストリ解析の組み合 わせのような定量的な方法が一定の有用性を有しており,また客観性,再現性の点でも優 れていると考えられる.

ただし,提案手法を含む自動的な細胞追跡手法として「完璧」な方法を実現するのは必 ずしも可能とは限らないため,多状態イベントヒストリ解析を適用する段階で多少の追跡 誤りが含まれている可能性を考慮する必要がある.例えば未追跡細胞の存在は多状態イベ ントヒストリ解析に用いる情報の損失となる.また図 2.19 のような追跡対象の取違えは, 本来生じていない細胞周期進行を抽出するため,解析結果を誤った方向に導くおそれがあ る.ImageJのツールのように追跡結果を手作業で修正すれば,完全に誤りのないデータ を解析に用いることができるが,手作業で処理できる細胞数や動画像数,実験条件数には 限りがある.そのため,実用問題への適用を考えると,追跡誤りが解析の結果に与える影 響(どの程度の誤りであれば許容できるか)を明らかにすることが必要になると考えられ る.複数の対象を追跡する問題における「誤り」には様々な種類があり,それゆえ 2.6.1.4 節で列挙したように多種多様な評価指標が用いられている.従って,追跡誤りの種類や程 度が評価指標および解析結果へ与える影響を網羅的に調べることが,今後の課題として挙 げられる.

本解析では,提案手法で色相と明度によって推定される細胞周期の状態そのものに多状 態イベントヒストリ解析を適用した.しかしながら,解析の目的によっては,より厳密に 細胞周期の位相を推定することも必要となり得る.例えばS期の開始点をより正確に知る 必要があるならば,Fucciの性質上,色相よりもむしろ緑色蛍光の強度によって状態を推 定すべきと考えられる.また,M期への進行を阻害する抗癌剤 [94] や細胞死 (アポトー シス)を誘導する抗癌剤 [88] も知られている.こうした薬剤への細胞の応答を調べるに は,細胞分裂や細胞死の状態を他の状態と区別して検出した上で状態占有確率を推定する ことが必要になると考えられる.

2.8 結言

本章では、蛍光プローブ Fucci を導入した細胞を動画像から追跡する方法を提案した. 提案手法は一時的なオクルージョンに頑強なパーティクルフィルタ法を拡張した方法であ り、細胞周期の進行に伴うフレーム間の Fucci の蛍光色の変化を、細胞周期の状態の推定 を通じて予測・活用する.これにより蛍光強度の変動や蛍光色の変化に頑強な追跡を目指 した.ヒト肝癌由来細胞株 HuH7 のイメージングデータを用いた実験において,提案手 法は従来の検出と対応付けに基づく方法を上回る継続的追跡の性能を達成した.また,抗 癌剤の薬効評価や作用機序の解明といった応用を見据え,提案手法の結果に細胞周期の多 状態イベントヒストリ解析を適用し,抗癌剤の投与条件による癌細胞の細胞周期進行の差 異を抽出できることを確認した.

今後の展望として,Fucci 導入細胞以外の外観を変化させる細胞への応用が挙げられる. 2.3 節で述べたように,Fucci 以外にも状態に応じて蛍光色を変化させる蛍光標識技術は 多数開発されている.本章で提案した細胞追跡手法はFucci の示す赤,黄,緑という蛍光 色の変化を前提とした方法であったが,状態空間や状態・蛍光色の変化のモデルの定義を 変更することで,他の蛍光色変化を伴う細胞の追跡にも応用できると考えている.さら に,細胞の「状態」を形態や移動速度,密度や接触の有無といった「経時的に変化する要 素」として広く捉えることで,様々な細胞の外観変化を予測しながら追跡する方法へ拡張 できると期待される.

第3章 細胞の遊走軌跡解析のための

深度情報を考慮した深層学習による細胞追跡

3.1 緒言

細胞の遊走 (cell migration) は、細胞が何らかの刺激を受け、ある場所から異なる場所 に移動する現象である.遊走は生体の諸器官の形成、免疫応答、創傷治癒、癌の転移と いった多種多様な生物学的プロセスに密接に関与することが知られており [4,5]、その性 質や機序、制御機構等の理解が生物学や医学における重要な課題となっている.

タイムラプスイメージングによる細胞の動きの可視化は,遊走を理解するための基本 的な技法のひとつとなっている.なかでも,特殊な蛍光顕微鏡である2光子励起顕微鏡 (two-photon excitation microscopy) [15,16] は高い組織透過性と低い侵襲性を有し,試 料の表面や培地内にとどまらず,生体内 (in vivo) で遊走する細胞を可視化できる (生体 内イメージング (intravital imaging)).さらに,2光子励起顕微鏡では蛍光分子の励起が 特定の深度の焦点面のみで起こるため,焦点面を移動させながら繰り返し撮像すること で,複数の断層像 (マルチスライス) の系列として3次元 (3D) 画像を取得できる.タイ ムラプスイメージングで得られるマルチスライス 3D 動画像は,細胞の遊走を立体的に観 察することを可能にする.

イメージングで得られた動画像を用いた細胞遊走の理解のための主要なアプローチとし て、細胞追跡によって抽出した個々の細胞の移動軌跡の解析が挙げられる.特に生体内に おける遊走細胞の移動傾向は細胞ごとの特性や周囲の環境要因によって常に変化し得るた め、細胞種が同じであっても個体ごとに異なる挙動を示す場合や、同一の細胞であっても 時刻によって挙動を変化させる場合がある.前者の例として、免疫細胞の一種であるマク ロファージ (macrophage)は、個体ごとの遺伝子発現パターンの違いによって移動パター ン (小幅の行き来を繰り返す、血管に沿って大きく移動する等)が異なることが知られて いる [95].後者の例として、病原体等の異物や細胞死を起こした細胞を排除するための 炎症 (inflammation)が発生すると、各種免疫細胞はサイトカイン (cytokine)と呼ばれ る種々のタンパク質に誘引されて移動する [9] ほか、核酸や脂質といったもともと生体内 に存在する物質に反応して発生する自然炎症 (homeostatic inflammation) も知られてい る [96].また、細胞間の相互作用も動態に影響を与える場合があり、免疫細胞の一種であ る T 細胞 (T cell) はリンパ節内における樹状細胞 (dendritic cell) との接触によって移 動・拡散の大きさをや増殖の速度を段階的に変化させる [97] ほか,ウイルス感染細胞や癌 細胞の細胞死 (アポトーシス)を接触を通じて引き起こす [98]. このような現象は,必ず しもイメージングで可視化できるとは限らないため,動画像のどの時点で移動傾向を変化 させる要因が発生したかを知ることは困難になり得る. そのため,生体内の遊走を理解す る上で,細胞ごとに移動軌跡を抽出する細胞追跡は重要なタスクであり,個々の細胞を見 失ったり取り違えたりせず継続的に追跡する方法が有用となり得る.

本研究では、生体内イメージングで得られたマルチスライス 3D 動画像から、細胞追跡 を通じて個々の細胞の移動軌跡を抽出する方法を開発し、遊走軌跡の解析に資することを 目指す.生体内イメージングデータでは、多数の細胞が密集し、さらに深度方向の重畳・ 交差も頻繁に発生する.こうした状況で、個々の細胞を見失ったり取り違えずに追跡す るには、類似した細胞同士を精緻に区別する方法が有用と考えられる.そこで本研究で は、外観の類似した追跡対象を区別して追跡することに長けた深層学習(deep learning) ベースの追跡手法を応用する.深層学習では、その根幹となる深層学習モデルの訓練(最 適化)に教師(「正解」)付きデータが必要となる.しかしながら、マルチスライス 3D 動 画像からの細胞追跡では、教師データ、すなわち正しい追跡結果を人力で付与するアノ テーション (annotation) にかかるコストが大きいため、従来は最大値投影法 (maximum intensity projection; MIP) によっていったん 2 次元 (2D) に変換した上で訓練や追跡が 行われていた.この操作によって各細胞の深度の情報が失われるため、細胞が深度方向に 頻繁に重畳する生体内イメージングデータにおいて、個々の細胞の継続的な追跡を難しく する要因となっていた [99].

この問題に対し,本研究は 2D のデータで訓練された物体追跡用の深層学習モデルを用 い,マルチスライス 3D 動画像から細胞を追跡する方法を提案する.提案手法では,細胞 の 2D 平面上の位置だけでなく深度を同時に推定し,深度によって密集・重畳した細胞を 区別することで,追跡対象の見失いや取違えを防ぎ継続的な追跡を実現する.

本章の以降の部分では,3.2節で遊走軌跡解析の重要性と,生体内イメージングによる 細胞遊走の可視化について述べる.3.3節では生体内イメージングで得られるマルチスラ イス 3D 動画像を用いた細胞動態解析の例を挙げ,細胞追跡の意義を示す.3.4節ではマ ルチスライス 3D 動画像における従来の細胞追跡手法の適用可能性を議論し,その課題に 対する本研究の提案手法を 3.5節で述べる.3.6節と 3.7節では,提案手法を実際の動画 像に適用する.前者で細胞追跡性能を定量的に評価したのち,後者では応用例として追跡 結果から細胞の移動速度の経時変化を解析する.最後に 3.8節で本研究を総括し,今後の

43

展望を述べる.

3.2 細胞遊走のイメージング

3.2.1 細胞遊走

細胞がある場所から異なる場所に移動する現象である遊走 (migration) は,生物の発生 と成長,機能維持において重要な役割を果たす [4]. 例えば生物の発生過程で起こる原腸 形成 (gastrulation) では,受精卵から分裂した多数の細胞が,表皮や眼 (外胚葉組織),筋 肉や血管 (中胚葉組織),内蔵器官 (内胚葉組織) といった様々な組織・器官へと分化・成 長する前段階として,各細胞が適切な場所へ移動 (遊走) する [100]. 成体においても,病 原体等の異物の侵入や創傷が発生すると,好中球やマクロファージ,樹状細胞,リンパ球 といった免疫細胞がそれぞれ適切な場所に遊走し,異物や死んだ細胞を消化する食作用, 異物の情報を伝達する抗原提示,抗体の産生といった各々の役割を果たすことで生命機能 維持に貢献している [9].

様々な生物学的プロセスにおける細胞遊走の性質や機序,制御機構を理解する上では, 様々な条件下における細胞の遊走を観察し,それらの差異を明らかにすることが重要であ る.このような解析においては,個々の細胞がどのように移動したのかを可視化するイ メージングが中心的な役割を果たしている.次節では,細胞遊走の可視化に適した,2光 子励起顕微鏡による生体内イメージングについて説明する.

3.2.2 2 光子励起顕微鏡による生体内 3 次元イメージング

近年の蛍光観察技術の発展は、生きた細胞の運動を動画像(タイムラプス画像系列)と して可視化すること [16,101] を可能にした.特に細胞遊走の理解においては、2 光子励 起顕微鏡 (two-photon excitation microscopy) [15,16] が重要な技術のひとつとなってい る.2光子励起顕微鏡は蛍光顕微鏡の一種であるが、励起に2光子吸収過程を利用する点 が通常の蛍光顕微鏡とは異なっている.通常の蛍光顕微鏡が利用する1光子吸収過程で は、1つの蛍光分子が励起光の光子の1つを吸収して励起状態に遷移する.一方2光子吸 収過程では、蛍光分子が2つ (以上)の光子を同時に吸収する.この現象は自然界では非 常に稀にしか起こらないが、2光子励起顕微鏡ではフェムト秒パルスレーザーでフェムト 秒 (1000 兆分の1 秒) という短時間に高エネルギーの励起光を発生させ、それをレンズ で非常に狭い (1フェムトリットル = 1000 兆分の1 リットル) 空間に集めることで2光 子吸収過程の発生確率を高めている.2光子吸収過程では2つの光子で蛍光分子を励起さ せるため、1 光子励起過程と同じ波長の蛍光を得るのに必要な光子のエネルギーは半分で 済む. すなわち、1 光子励起過程で用いる励起光と比べて、2 倍の波長の励起光を照射す れば良い. このことは生体組織の観察において重要な利点をもたらす. 蛍光顕微鏡では、 試料内での励起光の散乱が試料深部の観察 (励起)を困難にするが、特に波長と比べて十 分小さなサイズの粒子が起こすレイリー散乱 (Rayleigh scattering) では、散乱光の強度 が波長の4 乗に反比例するという近似が知られている [102]. そのため、通常の蛍光顕微 鏡の2 倍の波長の励起光を用いる2 光子励起顕微鏡は散乱の影響を受けにくく、試料の 深部、特に生体内の細胞や組織の観察に適している. また、励起光のエネルギーが低く、 焦点面の局所以外には照射されないことから、細胞や組織へのダメージ (光毒性) の小さ い観察が可能である. このような技術を用いた生体内部の様子のイメージングは生体内イ メージング (intravital imaging) と呼ばれている [101].

2光子励起顕微鏡のもうひとつの重要な特長として、細胞動態の3次元観察が可能な点 が挙げられる.前述のように、2光子励起顕微鏡における蛍光分子の励起は集光点のある 焦点面のみで発生するため、焦点面以外の深度にある蛍光分子は画像上に可視化されな。 い.また,深部観察が可能な顕微鏡であるため、焦点面を深度方向に移動させることで、 異なる深度の蛍光画像を取得できる.従って2光子励起顕微鏡では、焦点面を深度方向に 動かしながら繰り返し撮像することで,複数の断層像 (スライス) という形で試料の 3 次 元 (3D) イメージングが可能である [103].このような画像データをマルチスライス 3D 画像 (multi-slice 3D image) と呼ぶ. マルチスライス 3D 画像の例を図 3.1 に示す. 図 3.1 は 3.6 節の実験で用いる 2 光子励起顕微鏡で撮影されたデータであり、好中球が緑色 蛍光で可視化されている. 図 3.1 (a) は Nikon NIS Element Viewer ソフトウェアを用 いてレンダリングした図であり,X-Z 平面側から見た様子を3次元的に可視化している. 図 3.1 (b) がマルチスライス 3D 画像の実態で,複数のスライス,つまり焦点面を変えて 撮像された 2 次元 (2D) の蛍光画像から構成されることを表している.このようなマルチ スライス 3D 画像は、細胞の動態を平面上だけでなく立体的に可視化するため、より詳し い動態解析を可能にしている.ただし、スライスの数が増えると撮影にかかる時間が延 び、その間に細胞が移動・変形してしまうおそれがある.そのため、特に免疫細胞のよう に大きく移動する細胞のイメージングでは、スライスの枚数を減らす、すなわち X-Y 平 面上と比較して深度方向の撮影範囲を小さくしたり撮影間隔を大きくしたりする必要があ る [43].

45



(a) 3D 可視化



(b) スライス

図 3.1 遊走する好中球を撮影したマルチスライス 3D 画像

3.3 マルチスライス 3D 動画像における細胞追跡の意義

2 光子励起顕微鏡による生体内イメージングは,幅広い細胞動態の解明に用いられている [4].既に免疫細胞 [97,104–106],癌細胞 [107–110],破骨細胞 [111,112],心筋細胞 [113],子宮マスト細胞 [114],神経系細胞 [115,116]等の動態が生体内イメージングによる 3D 動画像を用いて解析されている. イメージング対象の部位・臓器も皮膚,呼吸器

系,生殖器系,肝臓,消化管,膵臓,腎臓,脾臓,神経系等,多岐にわたっている [117]. また生体内のみでなく,近年注目を集めているオルガノイド (in vitro で幹細胞からつく られた 3D 臓器モデル) のイメージングでも 2 光子励起顕微鏡やその発展形が利用されて おり [118,119], 2 光子励起顕微鏡によるマルチスライス 3D 動画像が今後も産出され続 けると予想される.

本研究で開発するマルチスライス 3D 動画像からの細胞追跡手法は,こうした様々な生体内イメージングデータを用いた細胞動態解析に資する方法であり,その意義は大きいと考えられる.

3.4 従来の細胞追跡手法とその問題点

3.4.1 深層学習に基づく細胞追跡

細胞遊走を撮影した生体内イメージングデータでは、多数の細胞が密集し、深度方向の 重畳・交差が頻繁に発生する.マルチスライス 3D 画像ではそれらを立体的に観察できる ものの、3.2.2 節で述べたように、深度方向の撮影範囲や撮影間隔が制限されるため、重 畳する細胞は深度方向にも近接して(隣接するスライス等に)可視化される場合がある. このような状況で細胞同士を取り違えず継続的に追跡するには、何らかの特徴を用いて、 個々の細胞を正確に区別する仕組みが有効と考えられる.例えば検出と対応付けに基づく 細胞追跡 (2.4.1 節)であれば検出領域同士を対応付けるための類似度を、パーティクル フィルタ法 (2.4.2 節)ではパーティクルの尤度を、細胞の区別が可能な特徴を用いて設計 すれば良い.こうした識別に必要となる特徴は、古典的な細胞や物体の追跡手法では人力 で設計・調整されていた (hand-crafted feature と呼ばれる)が、個々の追跡対象(細胞) が同じ蛍光色の塊として可視化される生体内イメージングデータでは、それらを区別する ような画像特徴の設計は容易ではないと考えられる.

一方,近年発展の著しい深層学習 (deep learning) では,畳込みニューラルネットワーク (convolutional neural network; CNN) 等の大量のパラメータを有する複雑なモデル を,データからの学習 (訓練) によって最適化する.これにより,生体内イメージングデー タのような人力での特徴設計が難しいデータであっても,画像特徴を陽に記述することな く追跡に有用な特徴を抽出できると期待される.このことを踏まえ,本研究でも深層学習 をベースに提案手法を設計する.以下では,深層学習を用いた物体や細胞の追跡について 説明する.

47

3.4.1.1 深層学習と画像認識 何らかの計算を行う数理モデルをデータを用いて訓練 (最適化) する機械学習 (machine learning) のうち,近年特に目覚ましい発展を遂げてい る技術のひとつがニューラルネットワーク (neural network) [120] である.ニューラル ネットワークには多数のバリエーションが知られているが,特に画像の分類や画像内の対 象の認識 (検出や追跡) といったタスクでは畳込みニューラルネットワーク (CNN) が中 心的な役割を果たしている.

CNN の主要な構成要素は、画像に対し同じ次元数の行列 (フィルタまたはカーネルと 呼ばれる)を畳み込むフィルタ演算である. その結果得られる行列は入力画像の何らかの 特徴を表していると考えられるため、特徴マップ (feature map) と呼ばれる. CNN で は入力画像に多数の異なるフィルタを畳み込むことでマルチチャネルの特徴マップを得 る. この演算を行う機構は畳込み層 (convolutional layer) と呼ばれる. 一般的な CNN は、畳込み層を多数直列させることで複雑な特徴を抽出し、特徴マップを集約する全結合 層 (fully-connected layer) 等を挟んで所望の形式の出力を計算する. このように多層の ニューラルネットワークを用いた機械学習は深層学習 (deep learning) と呼ばれている.

CNN で用いられる多数のフィルタの各要素の値 (重み) は,一般的に教師付き訓練デー タを用いた訓練によって設定される.教師付きデータは CNN の入力となる画像データ と教師データ,すなわち CNN の所望の出力 (「正解」)のペアである.なお,訓練デー タを作成するために入力データ (画像) に教師データを付与する作業はアノテーション (annotation) と呼ばれる.CNN の訓練では,CNN の出力と正解との誤差 (損失) が小 さくなるように各フィルタを最適化する.一般的に,CNN を含む深層学習モデルが訓練 データ以外の未知の入力に対しても所望の結果を出力する汎化 (generalization) には,多 数の訓練データを用意し,それらに対する損失を平均的に最適化するような訓練が必要と される.

3.4.1.2 細胞追跡への応用 深層学習による動画像内の対象の追跡はコンピュータビ ジョンの分野で盛んに研究され、多数の方法が提案されている [121,122]. それらの多く は人物や乗り物といった一般的な物体を対象とした方法であるが、細胞追跡に応用する方 法も撮像系や細胞種などに応じて各論的に開発されている [49,99,123–127].

深層学習に基づく追跡手法の代表例として, CNN の一種である MDNet (multi-domain network) を用いた方法 (MDNet 法) [122] が挙げられる. MDNet 法はもともとは一般物 体の追跡のために提案された方法で,著者の知る限りこれまで細胞追跡には応用されてい

48



図 3.2 MDNet 法における追跡対象の検出

ない.しかしながら,外観の類似した追跡対象を精緻に区別することに長けており,また 追跡中にモデルを調整し続けることで追跡対象の形状変化にも対処できることから,同じ 蛍光色を示し,形を変えながら遊走する細胞の追跡にも適していると考えられる.こうし た理由から,3.5節で述べる本研究の提案手法も MDNet 法がベースとなっている.

MDNet 法は、与えられた 2D 動画像 (フレームを I_1, \dots, I_N と書く) と先頭フレーム I_1 における追跡対象の位置 \mathbf{b}_1 に対し、2 番目以降のフレームにおけるその対象の位置の 推定結果 $\mathbf{b}_2, \dots, \mathbf{b}_N$ を出力する。MDNet 法における対象の位置は対象を囲む外接矩形 (bounding box) として表現され、各 t ($1 \le t \le N$) に対する \mathbf{b}_t は矩形の左上の点の X 座標 x_t , 左上の点の Y 座標 y_t , 幅 w_t , 高さ h_t の 4 つ組である。

MDNet 法は 2 番目以降のフレームにおける対象を、フレーム番号の昇順に逐次的に 検出していく. あるフレーム I_t ($t \ge 2$) における \mathbf{b}_t は、図 3.2 のように前フレーム I_{t-1} で推定された対象位置 $\mathbf{b}_{t-1} = (x_{t-1}, y_{t-1}, w_{t-1}, h_{t-1})$ (赤色) の周辺から探索する. まず、 \mathbf{b}_{t-1} の周辺に K 個 (K は定数) の対象位置の候補 $\mathbf{b}'_{t,k} = \left(x'_{t,k}, y'_{t,k}, w'_{t,k}, h'_{t,k}\right)$ ($1 \le k \le K$)を以下の分布に従って生成する.

$$x'_{t,k} \sim G\left(x_{t-1}, (a_1 r_{t-1})^2\right),$$
 (3.1)

$$y'_{t,k} \sim G\left(y_{t-1}, (a_1 r_{t-1})^2\right),$$
 (3.2)

$$w_{t,k}' = w_{t-1} \cdot a_2^{\ q},\tag{3.3}$$

$$h'_{t,k} = h_{t-1} \cdot a_2^{\ q},\tag{3.4}$$

ただし $G(\mu, \sigma^2)$ は平均 μ ,標準偏差 σ の正規分布を表し, r_{t-1} は w_{t-1} と h_{t-1} の平均, $q \sim G(a_3, a_4), a_1, a_2, a_3, a_4$ は定数である.式 3.1, 3.2 は,MDNet 法が追跡対象の移 動距離 (速度) の範囲を細胞のサイズ (幅と高さの平均) で推定することを表している. 次に,各候補 $\mathbf{b}'_{t,k}$ について,矩形内の画像がどの程度追跡対象らしいかを表すスコアを MDNet で計算する. すなわち,画像 *I* から外接矩形 **b** で囲まれた領域を切り出す操作を *I*(**b**),切り出された画像 *J* に対して計算されるスコアを *m*(*J*) と表記すると,各 **b**'_{*t,k*} に ついて *m* $\left(I_t\left(\mathbf{b}'_{t,k}\right)\right)$ を求める.最後に,最も高いスコアを有する候補を現フレーム *I*_{*t*} における対象位置と推定する.つまり,

$$k_{\text{best}} = \underset{1 \le k \le K}{\arg \max} m \left(I_t \left(\mathbf{b}'_{t,k} \right) \right)$$
(3.5)

とおいて,

$$\mathbf{b}_t = \mathbf{b}'_{t,k_{\text{best}}} \tag{3.6}$$

とする. 以上の手続きを $t = 2, \cdots, N$ について繰り返すことで MDNet 法は追跡対象の 移動軌跡を推定する.

3.4.2 マルチスライス 3D 動画像における細胞追跡

MDNet 法を含む従来の深層学習による対象追跡手法は主に 2D 動画像を対象としており,マルチスライス 3D 動画像に直接適用できる手法は著者の知る限り提案されていない.

マルチスライス 3D 動画像における細胞追跡を実現する方法のひとつとして,2D 動画 像を対象とした追跡手法を 3D に拡張することが考えられる.3D 画像を入力として受け 取る 3D-CNN は,通常の CNN におけるフィルタ演算を 3 次元畳込みで置き換えて構成 されるモデルで,分類 [128,129] やセグメンテーション [130,131] のためのモデルが提案 されている.追跡用の 3D-CNN は著者の知る限り未だ開発されていないが,分類やセグ メンテーションのモデルと同様に,2D 画像用の細胞追跡手法を拡張して構築できると期 待される.

しかしながら,2D用の細胞追跡手法を単純に3Dに拡張すると,訓練データのアノ テーション,すなわち人力追跡にかかるコストが劇的に増大する.MDNet法を含む多く の深層学習による追跡手法では,追跡対象の位置はCNNとの親和性の高い外接矩形で表 現される [121,132]. この場合,3D追跡に拡張すると外接矩形は細胞を囲む直方体とな るため,アノテーションで指定すべき情報は,全細胞の全フレームにおけるある頂点のX 座標,Y座標,深度,幅,高さ,奥行きの6つ組となる.そのため,対象位置が外接矩形 (X座標,Y座標,幅,高さの4つ組)で表現される2D追跡と比較して,指定すべき項目 の数が1.5倍に増加し得る.また,深度と奥行きの抽出や深度方向に重畳した細胞のアノ テーションには,全てのスライスを確認することが必要となるため,目視すべき2D画像 の数は2D追跡の場合と比較してスライス数倍に増加する.



図 3.3 最大値投影法 (MIP) によるマルチスライス 3D 画像から 2D 画像への変換

このことを踏まえ,従来のマルチスライス 3D 動画像に対する細胞追跡は,入力動画像 を 2D 動画像に変換し,2D の追跡手法を適用することで実現されてきた [99]. 情報をで きるだけ損なわずマルチスライス 3D 画像を 2D 画像に変換する方法として,最大値投影 法 (maximum intensity projection; MIP) [133] が一般的に利用されている. MIP は図 3.3 のように,マルチスライス 3D 画像の X-Y 平面上の各座標で深度方向に輝度 (蛍光強 度) の最大値を選択することで 2D 画像を構成する.すなわちマルチスライス 3D 画像の 位置 (x, y, z) の輝度 (蛍光強度) を i(x, y, z) とおくと, MIP 画像の位置 (x, y) の輝度は

$$i_{\rm MIP}(x,y) = \max_{x} i(x,y,z)$$
 (3.7)

で計算される.

MIP は異なるスライスにある細胞 (蛍光強度の大きな点)を1枚の2D 画像に投影でき るが,深度の情報が失われるため,深度方向に重畳する細胞群を画像上で識別することが 困難となる.図3.4 は異なる細胞 A, B が深度 (Z) 方向に重畳する例であり,図3.4 左が Y-Z 平面側から見た様子である.両細胞は異なる深度に滞在しているため,図3.4 中央 に示すようにスライスでは分離して可視化されている.一方,図3.4 右の MIP 画像では



図 3.4 MIP 画像における深度方向に重畳する細胞

深度の情報が失われており,また細胞 A, B の外観に大きな差がないため,両者はひとつの細胞であるかのように同化して描かれている.こうした状況において,個々の細胞を見 失ったり取り違えたりせずに追跡することは,深層学習による方法であっても困難を極める [99].

以上の議論を踏まえ,次節では MDNet 法をベースとして,アノテーションコストを増 大させずにマルチスライス 3D 動画像を直接扱うように拡張することで,深度を考慮した 継続的な細胞追跡が可能な方法を提案する.

3.5 深度情報を考慮した深層学習による細胞追跡(提案手法)

3.5.1 概要

本研究では、細胞の遊走を蛍光観察したマルチスライス 3D 動画像について、視野内に 出現する細胞を追跡する手法を提案する.入力動画像は N 枚のフレーム I_1, \dots, I_N か ら構成され、各フレームは深度方向に D 枚のスライスから構成されるマルチスライス 3D 画像とする.チャネル数は任意であるが、蛍光画像以外のチャネルが含まれることは想定 しない.出力は視野内に出現する各細胞の推定位置である.従来の深層学習ベースの追跡 手法の大部分と同様、本研究でも細胞の位置は外接矩形で表現する.すなわち視野内の各 細胞 c の各フレーム I_t における外接矩形の推定値 $\mathbf{b}_t^{(c)} = \left(x_t^{(c)}, y_t^{(c)}, w_t^{(c)}, h_t^{(c)}\right)$ を出力す る.ただし $x_t^{(c)}, y_t^{(c)}$ は矩形の左上の点の座標であり、 $w_t^{(c)}, h_t^{(c)}$ はそれぞれ矩形の幅と高 さである.外接矩形を用いた追跡は、画像を入力とする CNN との親和性が良いだけでな く、追跡に続く動態解析に細胞のサイズ (長軸方向,短軸方向それぞれの長さ)をも利用 できるという利点もある.

本研究で提案する方法は、3.4.1.2節で説明した MDNet 法をマルチスライス 3D 動画像

に適用できるように拡張したものである。MDNet 法ではフレーム番号の昇順に各フレームにおける細胞の位置 (外接矩形)を推定していたが,提案手法では細胞の位置と同時に 深度を推定しながら追跡を進めることで,密集・重畳した細胞を継続して追跡することを 目指す.ここで,提案手法の計算する各フレーム I_t ($1 \le t \le N$) における細胞 c の推定 深度を $d_t^{(c)}$ と表記する.

以降では、3.5.2節で追跡の方法、3.5.3節で MDNet の訓練の方法をそれぞれ述べる.

3.5.2 細胞追跡の方法

提案手法は,最初に先頭フレーム *I*₁ から細胞を検出し,それらの深度を推定する.その後,2番目以降のフレーム *I*₂,...,*I_N* における各細胞の位置と深度を逐次的に推定していく.以下,各ステップを順に説明する.

3.5.2.1 先頭フレームからの細胞検出 MDNet 法は元来単一の対象を追跡する方法で あり,追跡対象は先頭フレーム内の外接矩形として指定されることを前提としていた.一 方,本研究では視野内の複数の細胞を追跡することを目指しているため,第2章の提案手 法と同様,最初に先頭フレームから細胞を検出し,その結果を細胞ごとの追跡器の初期値 として定める.

先頭フレーム I_1 (マルチスライス 3D 画像) から細胞を検出するため,提案手法では I_1 に MIP を適用した画像に 2D の細胞検出を適用し,検出された各細胞の深度を次節で述 べる方法で推定する ^{*4}. ここでは基本的に任意の検出手法を用いることができるが,本 研究では物体検出の分野で高い性能を発揮している深層学習モデル Faster R-CNN [134] を,事前に細胞画像で訓練した上で利用している.本ステップにより,各細胞 c の初期位 置の推定結果 $\mathbf{b}_1^{(c)} = \left(x_1^{(c)}, y_1^{(c)}, w_1^{(c)}, h_1^{(c)}\right)$ が得られる.

3.5.2.2 先頭フレームで検出された細胞の深度推定 続いて、先頭フレームで検出され た各細胞 c の初期深度を推定する.ここでは、外接矩形 $\mathbf{b}_{1}^{(c)}$ の囲む領域の細胞らしさを 全ての深度にわたって算出し、最も細胞らしい深度を初期深度と推定する.すなわち、次 式のように各スライスにおける $\mathbf{b}_{1}^{(c)}$ の囲む領域を MDNet に与え、出力されるスコアが

^{*4} MIP 画像ではなく各スライスから細胞を検出する方法も考えられるが、厚みのある細胞は複数のスライスにまたがって検出されると考えられるため、誤検出 (false positive)を避けるためには同じ細胞の領域同士をスライス間で対応付ける (隣接する異なる細胞同士は対応付けない)処理が別途必要となる.



図 3.5 提案手法による細胞位置と深度の推定

最大となるスライスの深度を $d_1^{(c)}$ とする.

$$d_1^{(c)} = \underset{1 \le d \le D}{\arg \max} m\left(I_1\left(\mathbf{b}_1^{(c)}, d\right)\right), \tag{3.8}$$

ただしマルチスライス画像に対し, 深度 *d* のスライスから外接矩形 **b** の囲む領域を切り 出す操作を *I*(**b**,*d*) と表記している.

3.5.2.3 2番目以降のフレームにおける細胞位置と深度の推定 各フレーム $I_t (2 \le t \le N)$ では,各細胞 c の推定位置 $\mathbf{b}_t^{(c)}$ と推定深度 $d_t^{(c)}$ を図 3.5 に示す方法で計算する.なお,図 3.5 では簡単のため細胞番号 c を省略している.

まず,前フレームにおける推定深度 $d_{t-1}^{(c)}$ の周辺の複数のスライスから,従来の MDNet 法と同様にサンプリングした候補位置を切り出す.そして,各候補位置について MDNet でスコアを計算し,最も高いスコアの候補を選ぶことで位置と深度を同時に推定する.こ こで,探索範囲となるスライスの枚数は前フレームで推定した細胞のサイズを用いて決定 する.各細胞の深度方向の移動速度は X-Y 平面上の移動速度と同じ傾向を有すると仮定 して,式 3.1, 3.2 と同様に正規分布 $G\left(d_{t-1}^{(c)}, (a_1r)^2\right)$ に従うと考える.現在の深度 $d_t^{(c)}$ は この分布の 95 % 信頼区間内,すなわち $\pm 2a_1r$ 内にあると推定し,その範囲を探索する. 以上の内容を整理すると,提案手法における $\mathbf{b}_t^{(c)}$ と $d_t^{(c)}$ は以下の手順で計算される.

1. MDNet 法と同様,前フレーム $I_t - 1$ で推定した細胞位置 $\mathbf{b}_{t-1}^{(c)}$ の周辺に,一定数 (K 個)の候補 $\mathbf{b}'_{t,k} = \left(x'_{t,k}, y'_{t,k}, w'_{t,k}, h'_{t,k}\right)$ (1 $\leq k \leq K$) を式 3.1–3.4 に従って生 成する. 生成された候補の集合を

$$\mathcal{B}_{t} = \left\{ \mathbf{b}_{t,k}' \mid 1 \le k \le K \right\} = \left\{ \left(x_{t,k}', y_{t,k}', w_{t,k}', h_{t,k}' \right) \mid 1 \le k \le K \right\}$$
(3.9)

とおく.

2. 現フレーム *I*t における深度の候補の集合 *D* を以下で定める.

$$\mathcal{D} = \left[d_{t-1}^{(c)} - \left\lfloor 2a_1 r \frac{p_{\mathrm{Z}}}{p_{\mathrm{XY}}} \right\rfloor, \ d_{t-1}^{(c)} + \left\lfloor 2a_1 r \frac{p_{\mathrm{Z}}}{p_{\mathrm{XY}}} \right\rfloor \right] \cap [1, D]$$
(3.10)

ただし集合 [*a*,*b*] は *a* 以上 *b* 以下の整数の集合を表す. *p*_{XY} は X–Y 平面上での画 素サイズ (一辺の長さ), *p*_Z は深度方向の画素サイズ (スライスの間隔) であり,式 3.10 では両者の比を乗ずることで移動速度のスケールを揃えている. また [1,*D*] との積集合を計算しているのは, 深度の候補が 0 以下または *D*+1 以上にならな いようにするためである.

3. 各候補領域の MDNet のスコアを,全ての候補深度のスライスで算出し,スコアが 最大となる領域と深度を選ぶ.これにより,追跡対象細胞の位置と深度を同時に推 定する.

$$\left(x_t^{(c)}, d_t^{(c)}\right) = \underset{(\mathbf{b}, d) \in \mathcal{B} \times \mathcal{D}}{\arg \max} m\left(I_t\left(\mathbf{b}, d\right)\right)$$
(3.11)

3.5.3 MDNet の訓練方法

提案手法で用いる MDNet は、与えられた 2D 画像に対しスコアを計算するという通常 の MDNet 法と同じ計算を行う.従って提案手法でも MDNet 法と同様の方法で MDNet を訓練すれば良い.また、提案手法は追跡にマルチスライス 3D 画像をそのまま利用する が、訓練には従来と同様に MIP 画像を用いることを提案する. MIP の特性上、必然的に スライス画像よりも多数の細胞が画像内に含まれることになり、より追跡の難しい例、す なわち訓練に効果的なデータとなり得ると考えられるためである.なお、この方法で必要 となる訓練データのアノテーションは、2D の MIP 画像の一部 (MDNet の入力となる矩 形領域) にスコアを付与することであり、アノテーションコストは従来の MDNet 法と同 等である.3.4.1.2 節で述べたように、2D の物体追跡手法を単純に拡張した 3D-CNN を 用いる場合、アノテーションには細胞位置(直方体)のX 座標、Y 座標、深度、幅、高 さ、奥行きの6つ組を 3D 動画像の各スライスを目視しながら指定する作業が必要とな る.従って、マルチスライス 3D 動画像から細胞を追跡するにもかかわらず 2D のアノ テーション、すなわち 2D 画像に対する矩形の X 座標、Y 座標、幅、高さを指定すれば十 分な提案手法は,細胞追跡のようにアノテーションに専門家の知識が求められるタスクに おいて,特に有用性が高いと考えられる.

3.6 評価実験

提案手法の性能を定量的に評価するため,提案手法を実際のマルチスライス 3D 動画像 に適用し,追跡結果を正解 (人力での追跡結果)と比較する実験を行った.

3.6.1 実験方法

3.6.1.1 イメージングデータ コラーゲンゲル培地を遊走する好中球を2光子励起顕微 鏡で可視化したマルチスライス 3D 動画像を利用した. データの例は図 3.1 に示されてい る. 動画像数は 13 で,そのうち2本ではリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) 25µg/ml の刺激,残り 11 本では単球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) 25ng/ml の刺激がそれぞれ加えられている. フ レーム数は LPS 刺激の動画像 2 本と GM-CSF 刺激の動画像 2 本が 91, GM-CSF 刺激 の動画像 9 本が 61 である.各フレームはいずれもいずれも1分間隔で撮影されている. いずれの画像も X-Y 平面上の解像度が 512 × 512, 1 画素のサイズは一辺が 0.5µm であ る. 深度方向は 3.0µm 間隔で 15 スライスが撮影されている.

3.6.1.2 追跡手法 提案手法の性能を,従来手法である MIP 画像を用いた MDNet 法 (以下 MDNet-MIP と表記) および LineageTracker と比較した.

3.6.1.3 交差検証 提案手法と MDNet-MIP に含まれる深層学習モデル MDNet は, 追跡に用いる前に教師付き訓練データ (動画像と追跡結果の正解のペア)を用いて訓練す る必要がある. 深層学習で獲得したいのは未知のデータに対する汎化性能であるから, 訓 練に用いる動画像 (訓練データ) と追跡性能の評価に用いる動画像 (テストデータ) は重複 しないように選ぶべきである. 本実験では, 訓練データとテストデータの選び方を変えて 繰り返し評価する5分割交差検証 (5-fold cross validation) を行った. すなわち, 全13 本の動画像を 2-3 本ずつの5 グループに分割し, そのうち1 グループをテストデータ, 残 り 4 グループを訓練データとして用いて評価することをテストデータを変えて 5 回繰り 返し, 結果を平均することで最終的な追跡性能を計算した.

なお, LineageTracker は訓練可能なパラメータを有さない方法であるため,全ての動 画像に対し事前に調整したパラメータを用いて追跡した.

3.6.1.4 実装

3.6.1.4.1 提案手法と MDNet-MIP 提案手法と MDNet-MIP は, Python 言語 と深層学習用フレームワーク PyTorch [135] を用いて実装し, Quadro RTX 8000 GPU を搭載した計算機にて実行した.

両手法における MDNet は MIP 画像と追跡結果の正解のペアを用いて訓練し,訓練済 みパラメータの値やネットワーク構造等を一切変更せず共通で利用した.訓練に要した時 間は1エポックあたり約 547 秒 (交差検証の全グループ間での平均) であり,20エポック 繰り返したため全体では約3時間であった.

MDNet のネットワーク構造を含むハイパパラメータはオリジナルの MDNet 法での設定 [122] に準拠した.特に式 3.1–3.4 においては $a_1 = 0.3$, $a_2 = 0.25$, $a_3 = 0$, $a_4 = 0.25$ と定めた.

3.6.1.4.2 LineageTracker LineageTracker は 2.6 節の実験と同様, ImageJ [17] のプラグインとして配布されている実装 [47] を利用した.

3.6.1.5 評価指標 2.6節の実験と同様に CLEAR 指標と MTC (mostly-tracked cells), MTH (mostly-tracking hypotheses), MLC (mostly-lost cells), MLH (mostly-lost hypotheses) を用いた. それぞれの定義は 2.6.1.4 節に示されている. ただし本研究では, 細胞の位置を重心座標 (単一点) ではなく外接矩形で表現しているため, 2.6.1.4 節の各指標の定義における「距離」は,「矩形同士の重なりの小ささ」を用いた. 矩形同士の重なり度合いは,両矩形の共通部分の面積を,いずれかが囲む領域 (和集合部分)の面積で割ったIoU (intersection-over-union) で定量化できる. 図 3.6 (a) に示すように, 2つの矩形 A, Bの共通部分の面積を $|A \cap B|$, 和集合部分の面積を $|A \cup B|$ と書くと, $A \ge B$ の IoU は

$$IoU = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \tag{3.12}$$

と定義される. なお, IoU は矩形同士が同一に近付くほど大きくなる (1 に近付く) ため, 点同士が近付くほど小さくなるという通常の距離の性質に合わせ,実際には 1 – IoU を 「距離」として用いた. また,各指標の計算に用いる距離 (1 – IoU) の閾値は 0.7,すなわ ち IoU の閾値を 0.3 と定めた. これは同じ大きさ (幅 w,高さ h)の矩形が,図 3.6 (b)の



(b) 計算例

図 3.6 2つの矩形同士の IoU (intersection-over-union)

ように幅・高さの両方向に 1/3 の長さだけずれたときの IoU が

$$IoU = \frac{(2/3)^2 wh}{2wh - (2/3)^2 wh} = \frac{2}{7} \approx 0.286$$
(3.13)

となることを踏まえたものである.

3.6.2 結果

3.6.2.1 定量的評価 各動画像内の細胞を提案手法と従来手法で追跡し,各指標を計算 した結果を表 3.1 に示す.表 3.1 の各欄は全動画像にわたる「平均値 ± 標準偏差」の形 式で記している.上矢印↑は値が大きいほど良い指標,下矢印↓は値が小さいほど良い 指標を表しており,各指標における最良の平均値は太字で強調している.提案手法は,表 3.1 のほとんどの指標で MDNet-MIP を含む従来手法を上回る性能を発揮している.特 に IDSW, MTC, MTH, MLC, MLH の改善は,提案手法の継続的追跡の性能が従来手法 より優れていることを示唆している.

3.6.2.2 追跡結果例 提案手法と従来の MDNet 法 (MDNet-MIP) の追跡結果が異 なっている例を図 3.7 に示す. 図 3.7 の上段では, MIP 画像上に正しい細胞位置の矩形,

		$\mathrm{TP}\uparrow$	FP	\downarrow	$\mathrm{FN}\downarrow$
į	提案手法	$\textbf{1,722.1} \pm 2,3$	03.6 111.1 \pm	= 88.1 11 1	1.1 ± 88.1
I	MDNet-MIP	$1,706.0 \pm 2,3$	17.5 127.2 \pm	117.6 12	7.2 ± 117.6
Ι	LineageTracker	$1,137.9 \pm 1,4$	76.1 110.8 ±	- 90.9 69	5.2 ± 893.8
		$\operatorname{Prec} \uparrow$	$\operatorname{Rec}\uparrow$	· M	OTP ↑
	提案手法	0.914 ± 0.0	54 0.914 \pm 0).054 0.680	6 ± 0.047
	MDNet-MIP	0.897 ± 0.0	$76 0.897 \pm 0$).076 0.70	7 ± 0.045
	LineageTracker	0.865 ± 0.1	$08 0.641 \pm 0$).122 0.524	4 ± 0.050
		$\mathrm{IDSW}\downarrow$	Frag	L MO	$TA\uparrow$
	提案手法	$3.154 \pm 4.$	588 12.7 \pm 1	0.9 0.826	± 0.111
	MDNet-MIP	5.077 ± 8.5	695 12.7 ± 1	0.6 0.792	± 0.154
	LineageTracke	$3.538 \pm 4.$	$069 34.5 \pm 2$	29.5 0.537	± 0.179
	MT	$C \uparrow N$	ITH ↑	MLC \downarrow	$\mathrm{MLH}\downarrow$
提案手	法 0.892:	± 0.073 0.89	0 ± 0.076 0.0	012 ± 0.017	$\textbf{0.013} \pm 0.020$
MDNe	et-MIP 0.864 :	$\pm 0.088 0.86$	4 ± 0.088 0.	017 ± 0.025	0.018 ± 0.025
Lineage	eTracker 0.463 :	$\pm 0.159 0.66$	3 ± 0.223 0.	187 ± 0.102	0.045 ± 0.065

表 3.1 追跡結果の定量的評価 (平均値 ± 標準偏差)

提案手法が推定した細胞位置の矩形, MDNet-MIP が推定した細胞位置の矩形をそれぞ れ白色,赤色,水色で描画している.図 3.7 の下段は各フレームを Y-Z 平面側から見た 様子である.追跡対象は下段で注釈された細胞であり,別の細胞の下をくぐり抜けている (深度方向の重畳).上段の MIP 画像では深度の情報が失われ,両者の識別が困難となっ ている.そのため MIP 画像上で追跡を行う MDNet-MIP は両者を誤認し,重畳が解かれ た後 (一番右の列) には元の追跡対象とは異なる細胞を追跡している.一方の提案手法は 追跡対象の推定深度によって細胞同士を区別しているため,元の追跡対象を継続して捉え ている.





図 3.7 提案手法と従来の MDNet 法の追跡結果の例 (上段: MIP 画像と追跡結果,下 段: 3D 可視化)

3.6.3 考察

表 3.1 で示したように,継続的な追跡に関する指標 IDSW, MTC, MTH, MLC, MLH について,提案手法は MDNet 法を MIP 画像に適用した MDNet-MIP を含む従来手法 を上回る性能を達成した.また,図 3.7 のように MIP 画像を用いた従来手法では困難で あった,深度方向に重畳する細胞の継続的な追跡が可能であることも確認できた.提案手 法が MDNet-MIP と異なる点は,各フレームで追跡対象を検出する際に深度を同時に推 定し,次フレームでの検出に活用する点のみであり,モデルの構造やハイパパラメータ, 訓練によって最適化されるパラメータは一切変更していない.これらのことから,提案手 法によって可能となった継続的追跡では,深度情報を推定・活用する仕組みが中心的な役 割を果たしていると考えられる.

表 3.1 において,提案手法および MDNet-MIP の FP (誤検出数) は LineageTracker の結果を下回っている.この原因としては,第2章の提案手法と同様,追跡器の「衝突」 が考えられる.実際に衝突が発生している例を図 3.8 に示す.図 3.8 では,各フレームで 推定された細胞位置を矩形で,それ以前の矩形の重心位置の移動軌跡を線でそれぞれ描 画している.細胞1と細胞13 が接近した結果,細胞13を追跡する追跡器が細胞1を追 跡対象と誤認し (#10),その後は細胞1 を両方の追跡器が捉えている.両細胞は外観が 類似しており,X-Y 平面上でも深度方向でも近い位置を通過しているため,両方の追跡



図 3.8 追跡器の「衝突」(複数の追跡器が同じ細胞を追跡する)の例

器が細胞位置の候補として細胞1の領域をサンプリングし,その候補を対象位置の推定 値として選択してしまっている.本実験で用いた CLEAR 指標の計算では,各細胞はフ レームごとに1つの追跡器のみと対応付けられるので,このような追跡器の衝突が発生す ると,対応付いた追跡器以外の追跡結果は全て誤検出 (FP) として計上される.加えて, 提案手法および MDNet-MIP は追跡器の衝突を検知する仕組みを有していないため,一 度発生した衝突の影響は次フレーム以降にも波及する.これらのことが提案手法および MDNet-MIP の FP が増大した主な原因と考えられる.

追跡器の衝突による誤りは個々の細胞の継続的な追跡を阻むものであり、追跡結果を用 いた解析を誤った方向に導く可能性がある.特に移動の傾向(速度や方向等)が異なる細 胞同士の間で取違えが発生すると、その後の軌跡解析で、(本来は生じていない) 遊走途中 での動態の変化が検出されたりするおそれがある.同時に未追跡の細胞が生じるため、解 析に利用できる軌跡情報の減少を引き起こすとともに,他の細胞の追跡誤りの原因ともな り得る.従って、追跡器の衝突は提案手法の重要な課題のひとつと言える.衝突を防ぐ方 法として,第2章の提案手法と同様,追跡器同士の境界線を越えてサンプリングされた 候補を破棄することが考えられる.しかしながら、本研究が解明を目指す生体内における 細胞の遊走では細胞同士が立体的に密集し得るため,単純に境界線を越えて追跡対象を探 索しないという方法は,さらなる追跡誤りを引き起こすおそれがある.別のアプローチと して、細胞位置の推定の際、複数の候補領域を別々の細胞として採用することが考えられ る. 提案手法および MDNet-MIP では MDNet のスコアが最大の候補位置を細胞位置と 推定するが,それだけでなくある程度高いスコアを有する全ての候補から,領域が重複す るものを NMS (non-maximum supression) [136] 等で排除し,残った全ての候補 (現在 は衝突によって見失われている細胞も含む) を別々の細胞として新たに追跡を開始すると いう方針である.ただしこのアプローチでは、追跡結果の軌跡に分岐が生じるため、分岐 前後で同じ細胞同士の軌跡を識別して対応付けるための方法が別途必要となる.

(a) LPS 刺激		(b) GM-0	(b) GM-CSF 刺激			(c) PMA 刺激		
フレーム数	動画像数	フレーム数	動画像数		フレーム数	動画像数		
16	57	16	15		91	3		
61	1	31	1		合計	3		
91	8	46	3					
合計	66	61	45					
		91	18					
		合計	82	-				

表 3.2 解析に用いた動画像のフレーム数

3.7 追跡結果を用いた遊走軌跡解析

提案手法の応用例として,実験条件 (刺激)の違いによって細胞の移動速度の経時変化 に生じる差異を解析した.細胞の移動速度は特に免疫細胞の遊走に関する研究で広く用い られている解析対象であり [97,137,138],炎症等の免疫応答において各種免疫細胞がどの 程度活発にはたらいているかを定量化するための基本的な特徴量となる.

本解析では、コラーゲンゲル培地を遊走する好中球を 2 光子励起顕微鏡で可視化し たマルチスライス 3D 動画像を利用した.動画像数は 151 で、このうち 66 本は LPS 10µg/ml, 82 本は GM-CSF 25ng/ml, 3 本は PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 1µg/ml の刺激がそれぞれ加えられている. なお LPS, GM-CSF, PMA はいずれも炎症 反応を引き起こすことが知られており、免疫細胞の刺激剤として幅広い研究に用いられて いる [139–141].

本解析で用いた動画像のフレーム数は表 3.2 の通りであり,いずれも 1 分間隔で撮影されている.全てのフレームにおいて X-Y 平面の解像度は 512 × 512,1 画素のサイズはGM-CSF 刺激の動画像 1 本のみ 0.25µm,その他の動画像では 0.5µm となっている.深度方向は 3.0µm 間隔で 15 スライスが撮影されている.

提案手法で各動画像の好中球を追跡し,得られた各細胞の位置 (外接矩形の重心)の時 系列から移動速度 (1µs あたりの移動距離)の時系列を計算した.それらを刺激ごとに 分け,各時刻で平均した結果を図 3.9 に示す.図 3.9 では,LPS 刺激を与えた細胞 (青 線)の移動速度は比較的小さいが,50 フレーム目 (50 分) 付近から徐々に向上している.


図 3.9 提案手法で抽出した好中球の平均速度の経時変化

GM-CSF 刺激の細胞 (橙線) は早い段階から速度を上げ,その後もよく動き続ける傾向が 確認できる.PMA 刺激の細胞 (緑線) も早い段階からよく動くが,一度速度が鈍ったの ちに再び加速している.以上の結果から,刺激の違いによって好中球の移動傾向 (速度) の経時変化に生じる差異を抽出できた.

Heryanto et al. [142] は LPS, GM-CSF, PMA の 3 種類の刺激によってコラーゲンゲ ル培地を遊走する好中球の移動と形状変化の傾向が異なることを示している. 従って細胞 の移動速度の経時変化が刺激によって異なるという本解析の結果は, 当該研究とは異なる 特徴量を用いたものではあるものの, 既報の結果とは矛盾していないと言える.

各細胞の移動速度が一定である場合や視野内の細胞の移動速度にばらつきがない場合に は、オプティカルフロー [143] 等で瞬間的な (例えば連続する 2 フレーム間のみでの) 移 動を推定すれば、経時変化を含む細胞の長期的な移動傾向も明らかになり得る.しかしな がら、個体ごとに異なる移動傾向やその経時変動を示す細胞の長期的な動態は、瞬間的な 動態から推定することが困難な可能性があり、個々の細胞を取り違えたり見失ったりせず に継続的に追跡することが重要になると考えられる.本解析の結果は、個々の細胞の移動 速度が経時的に変化し、その傾向が刺激の種類によって異なることを明らかにするもので あり、提案手法による細胞の継続的追跡の効果を示すものと言える.現状は提案手法でも 細胞の取違え・見失いといった追跡誤りは発生しているが、今後さらに性能を改善するこ とで、細胞遊走解析の一手法としての有用性を増していくと期待される.また、その際に

は 2.7 節でも考察したような,追跡誤りが解析に及ぼす影響の網羅的な検証も必要になる と考えられる.

3.8 結言

本章では、2 光子励起顕微鏡を用いた生体内イメージングで得られるマルチスライス 3D 動画像を対象とした、遊走する細胞の追跡手法を提案した.提案手法は深層学習モデ ル MDNet を用いた 2D 動画像に対する物体追跡手法 (MDNet 法) を拡張した方法であ り、先頭フレームから順に追跡対象の細胞を検出する際、細胞の位置と同時に深度を推定 する. これにより深度方向に重畳した細胞を区別しながら、継続的に追跡することが可能 となった.また、提案手法における深層学習モデル MDNet は、2D 動画像用の MDNet 法と同様、1 枚の 2D 画像 (スライス) の小領域に対してスコア (追跡対象らしさ)を計算 する. 従って提案手法は MDNet 法と同一のモデル、すなわち 2D のアノテーションで訓 練された MDNet を用いて 3D 画像内の細胞を追跡することができ、追跡性能の高さと アノテーションコストの低さを両立した方法と言える.

本研究では,提案手法をコラーゲンゲル培地内を遊走する好中球の追跡に適用し,提案 手法の継続的な追跡の性能が,MIP 画像を用いた MDNet 法を含む従来手法を上回るこ とを確認した.また,提案手法を用いて好中球の移動速度の経時変化を抽出し,刺激の違 いによる差異を解明した.

2 光子励起顕微鏡による生体内の 3D タイムラプスイメージングは,3.3 節で列挙した ように幅広い細胞や部位・臓器を対象として行われている.本研究の提案手法はデータを 用いた訓練によって追跡モデル (MDNet) を最適化する深層学習手法であるため,多種多 様な生体内イメージングデータに適用でき,広範な細胞動態の解明に寄与し得ると考えら れる.

さらに、本研究の成果は人物や乗り物といった一般的な物体の追跡にも貢献すると期待 できる.通常の単眼カメラでは生体内イメージングデータのような 3D 画像は得られない が、近年は深度情報を出力するカメラとして、ステレオカメラ [144] や、画像と赤外光に よる深度推定 (time of flight; ToF) [145] による深度マップの組を出力するカメラが市販 されている.また、単眼カメラで撮影される 2D 画像から、画像内の物体の深度を推定す る画像処理技術も古くから研究されている [146].こうした画像内の深度推定の技術を、 深度に基づいて異なる追跡対象を区別するという本研究の成果と統合することで、追跡対 象の深度方向の重畳、すなわち追跡対象が別の対象の奥に隠れるオクルージョンに頑強な 一般物体追跡手法が実現できると考えられる.同様に,一般的な蛍光顕微鏡が産出する 2D 動画像における深度情報を考慮した細胞追跡も期待できる.蛍光イメージングで可視 化された細胞は外観上の特徴に乏しいため,2D 画像からの深度推定は必ずしも容易では ないが,第2章で行ったように微分干渉顕微鏡や位相差顕微鏡で取得できる細胞表面の凹 凸の情報を活用することで,ある程度推定しやすくなる可能性がある.

本研究の今後の課題として、3.6.3節で考察したような追跡器の「衝突」の改善に加え、 実際の生体内 (in vivo) をイメージングしたデータへの適用が挙げられる.本研究の実験 で用いたデータは生体内イメージング用の 2 光子励起顕微鏡で取得されているが,撮影対 象はコラーゲンゲル培地 (in vitro) を遊走する細胞であった.in vitro での細胞実験は, 刺激やサイトカインの濃度勾配を限定することができる (生体内の諸器官の相互作用等に よる影響を排除できる) ため, 遊走の機序や環境要因との関係を調べるような目的に適し ている.またコラーゲンゲル培地は、コラーゲンが哺乳類の全タンパク質の約 30 % を占 めるとされること [147], コラーゲン線維が生体内で細胞を物理的に支える役割を担って いること [148] といった生体内の環境との近さから、細胞の3次元培養に広く利用されて いる.これらのことから、コラーゲンゲル培地上の細胞の追跡における提案手法の有効性 を明らかにした本研究の成果もある程度の有用性を有すると考えられる.しかしながら, 生体内イメージングの本領は in vivo の可視化であり、また実際に生体内で起きている現 象の理解には in vivo での細胞動態の解析が重要となる.in vivo のイメージングデータ では,自家蛍光等の追跡を難しくする要因が含まれている可能性があるほか,細胞外の線 維や組織といった細胞外マトリックス (extracellular matrix) が細胞の移動パターンを変 化させることが示唆されている [149].従って,in vivo における提案手法の有効性や改良 の余地を検討することが今後求められる.

3.7 節では,細胞の 2D 平面上の位置の時系列から計算した移動速度を解析に用いた. しかしながら,本研究の提案手法は各細胞の 2D 平面上の位置と深度を同時に推定するた め,深度の情報も解析に利用することが可能であり,その意義も大きいと考えられる.例 えば 3.7 節で着目した細胞の移動速度は,厳密には深度方向の移動量も用いて算出すべき であり,2D 平面上の速度のみを用いる場合,深度方向の移動距離に大きな差があるよう な細胞群における動態の差異を正しく抽出できない可能性がある.また,深度方向の形態 変化 (仮足の突出等)や細胞同士の深度方向の接近や相互作用は,深度情報を用いること で検出できると考えられる.ただし,現在の2光子励起顕微鏡における深度方向の撮影範 囲や分解能は平面上のそれらに比べて圧倒的に小さく抑えざるを得ない [43] ため,特に

細胞が密集するような場合,解析に十分な深度情報を取得することは容易ではないと考え られる.一方,2光子励起顕微鏡における深度方向の撮影範囲や分解能を大きくする研究 も精力的に進められており [43,150–152],今後は3Dイメージングで得られた深度情報を 動態解析に利用しやすくなることが期待できる.その場合,追跡によって細胞の位置だけ でなく深度をも抽出する本研究の提案手法は,深度情報も含めた解析に即座に利用できる 点で有用性が高い方法となり得る.同時に,深度をより精緻に推定できるようになると考 えられるため,推定深度を追跡にも活用する提案手法について,さらなる精度向上も期待 できる.

第4章 結論

本研究では、生きた細胞の蛍光イメージングデータを用いた細胞動態解析のための、 個々の細胞の移動軌跡を抽出する細胞追跡手法の実現を目指した.従来、蛍光イメージン グデータからの細胞追跡は手動または半自動で行われてきたが、技術発展によって産出さ れるようになりつつある膨大な量のデータから、効率的かつ客観的に細胞動態に関する知 識を発見するためには、情報技術による自動的な細胞追跡の開発が急務であった.また、 長期間にわたる動態の解析には、個々の細胞を取り違えたり見失ったりすることなく継続 して追跡することが求められていた.生命現象には様々な細胞動態が関与するが、本研究 ではその中でも細胞周期進行と細胞遊走を対象として、それぞれの履歴情報を動画像から 抽出するための細胞追跡手法を開発した.

本研究の1つ目の成果は,細胞周期解析のための,Fucci 導入細胞のタイムラプスイ メージングで得られる動画像における細胞追跡手法の提案である. Fucci 導入細胞の追跡 では,不安定な蛍光強度と蛍光色の変化という細胞の外観の経時変化が継続的な追跡を 阻む要因となっていた.提案手法では、前者については一時的なオクルージョンに頑強 なパーティクルフィルタ法を応用することで対処し、後者については各フレームにおけ る細胞の検出と同時に推定した細胞の状態(細胞周期の進行度合い)に基づいて検出に用 いるモデル (尤度)を使い分けることで対処した.実際のイメージングデータを用いた実 験により,提案手法の継続的追跡の性能が従来の細胞追跡手法を上回ることが確認でき, Fucci 導入細胞の追跡への提案手法の有効性が示された.さらに応用例として,抗癌剤の 投与条件の異なる癌細胞の細胞周期の時系列を提案手法を用いて抽出し,多状態イベント ヒストリ解析を適用した.その結果、条件の違いによって生じる細胞周期進行の差異が明 らかになった.細胞周期は癌細胞の増殖と抗癌剤による増殖阻害を理解する上で有用とな り得るほか、生物の発生や幹細胞の分化といった生物学的プロセスにも関与する重要な研 究対象である.Fucci の登場後,Fucci 導入細胞のタイムラプスイメージングを通じて細 胞周期が解析されてきたが、解析の前段となる細胞追跡は手作業または半自動で行われて おり、細胞周期研究におけるボトルネックとなっていた.本成果は細胞の高精度な自動追 跡を通じて効率的かつ客観的な細胞周期研究に貢献するものであり、生物学や医学、薬学 分野で重要な細胞周期の理解を進展させ得ると考えられる.

本研究の2つ目の成果は、細胞の遊走軌跡解析のための、生体内イメージングで得られ るマルチスライス 3D 動画像における遊走細胞の追跡手法の提案である. 生体内イメージ

ングデータでは、個々の細胞は同色の輝点の集まりとして可視化されるため、密集した場 合にそれらを区別して追跡することが容易ではなかった.そうしたデータには高い表現力 を有する深層学習の有効性が期待されるが、3D 画像では深層学習モデルの訓練に必要と なる訓練データのアノテーション、すなわち人力追跡による正解の付与に膨大なコストが かかるため, 従来は MIP で 2D 動画像に変換した上で訓練・追跡が行われていた. しか しながら MIP は深度情報を保持しないため、2D 平面上で密集した細胞や深度方向に重 畳した細胞が一体として投影されてしまい,たとえ深層学習に基づく方法であっても細 胞の見失いや取違えが発生しやすかった. 提案手法は 2D 動画像における深層学習モデル MDNet を用いた物体追跡手法 (MDNet 法) を、MDNet 自体の入出力と計算内容はその ままにした上でマルチスライス 3D 動画像に適用できるように拡張した方法である. これ により、2D のアノテーションのみを用いて訓練した MDNet で、密集・重畳した細胞を 深度によって区別しながら追跡することが可能となった. 実際のイメージングデータを用 いた実験により、提案手法の継続的追跡の性能が、MIP 画像を用いた MDNet 法を含む 従来手法を上回ることが確認でき,深度情報の活用が密集・重畳した細胞の精緻な追跡に 有効であることが示された.さらに、提案手法を用いて抽出した細胞ごとの移動速度の時 系列を用いて、刺激の違いによって生じる遊走する好中球の移動傾向の差異を明らかにし た.細胞の遊走は生物の発生段階から成体の生命維持に至るまで、幅広い生物学的プロセ スにおいて重要な役割を果たすことが知られており、その性質や機序、制御機構を理解す ることが生物を理解する上で重要となっている.本成果は細胞の高精度な追跡を通じて細 胞遊走の研究を効率化するとともに、客観的かつ再現性のある解析にもつながるものであ ると期待される.

1.1 節で列挙したように、蛍光イメージングデータには継続的な追跡を阻む様々な要因 が存在し得る.本研究ではそれらのうち、「外観の経時変化」および「外観の類似した細 胞の密集・重畳」の2点に着目し、それぞれが特に顕著に発生するイメージングデータを 対象として継続的な細胞追跡の方法を提案した.外観の経時変化については、細胞の位置 だけでなく「状態」をも推定し、推定された状態から予測される外観 (本研究の場合は蛍 光色)の変化を追跡に活用することで対処した.外観上の類似した追跡対象の密集・重畳 については、細胞の位置と深度を同時に推定し、推定された深度で密集・重畳した細胞を 区別することで対処した.いずれの成果も、現状は特定の種類のイメージングデータに特 化した手法ではあるものの、提案手法を異なる状態空間に応用したり 2D 画像からの深度 推定の方法と統合したりすることで、幅広い蛍光イメージングデータにおける細胞追跡に



図 4.1 動態特徴をフィードバックした深層学習による細胞追跡手法の構想

適用できるようになると期待される.

従来の細胞追跡手法の多くは,外観の特徴が比較的豊富な一般物体の追跡手法をベース として設計されており,動画像の外観の特徴を重視して追跡する方法となっていた.しか しながら,蛍光イメージングデータでは追跡対象同士を外観で区別することが容易でな く,またその外観も時々刻々と変化し得ることから,細胞動態の解析に資する継続的な 追跡は困難な課題であった.一方,本研究では細胞の状態や深度(細胞位置の一要素)と いったある種の動態情報を活用することで,密集・重畳した細胞や外観の変化を伴う細胞 を高精度に追跡した.この成果から,細胞追跡で抽出される動態情報が解析に利用できる だけでなく,追跡器へのフィードバックを通じて細胞追跡の高精度化に資することが示唆 される.

追跡に有用な動態情報としては、本研究で扱った細胞周期の状態や細胞の深度以外にも 様々なものが考えられる.例えば Fucci 以外の蛍光プローブを導入した細胞の追跡でも、 当該プローブの示す蛍光特性 (色や強度)を「状態」として扱うことが追跡に有用と期待さ れる.また、細胞ごとの深度と同様に個々の細胞を区別するための特徴として、追跡済み の軌跡から計算される移動傾向 (速度等)も有用と考えられる.こうした多種多様な動態 情報から追跡に有用な特徴を抽出・活用するためには、データからエンドツーエンドの学 習を通じて特徴抽出能力を獲得する深層学習の有効性が期待される.特に第3章でベース とした MDNet 法のように、動画像の先頭フレームから順に細胞を検出していく方法は、 ひとつ前のフレームまでの追跡結果から計算される動態特徴を活用しやすい.そこで、今 後の展望として図 4.1 に示すような MDNet 法の拡張を考えている.図 4.1 は、各フレー ムにおける追跡対象位置 (外接矩形) の候補のスコアを計算する手順を示しており,前フ レームまでの追跡結果から深層学習モデルで抽出した動態特徴を,候補領域の外観 (画像 の一部) とともにスコア計算用の拡張版 MDNet に入力している.これにより,現フレー ムにおける細胞の検出に外観と動態の両方の特徴を活用でき,細胞の見失いや取違えの少 ない継続的な追跡が可能と期待される.また,この方法の特徴抽出器は深層学習に基づい ているため,複数種の動態情報を統合した特徴を計算する能力も有している.例えば細胞 周期の状態と細胞の深度の両方から計算される特徴は,生体内イメージングデータ (マル チスライス 3D 動画像) における Fucci 導入細胞の追跡に有効と期待される.なお,Fucci のマウスやゼブラフィッシュ等の生体への導入は多数報告されており [54],2光子励起顕 微鏡で生体内の Fucci 導入細胞を可視化する研究も行われている [153].

異種の情報の活用は、追跡の後に続く細胞動態解析にも有用となり得る.例えば線維や 細胞外の組織の構造 [154], focal adhesion と呼ばれる細胞内の多タンパク質構造体 [155], 遺伝子発現パターン [95] といった追跡のみでは明らかにならない要因も細胞動態に影響 することが明らかになりつつある.今後は本研究の成果を発展させた上で、追跡で得られ る細胞の移動軌跡や状態の履歴をイメージング以外で得られた生命科学データとともに解 析することで、より複雑な生命現象の解明が可能になると期待される.

生物学研究や臨床検査の現場では,計算機制御による自動顕微鏡,細胞培養や試料の合成を自動で行うロボット等によるラボラトリオートメーション (laboratory automation; 研究室の自動化) [156] が進展しつつある.様々な実験条件の下で細胞集団を網羅的・高並列にイメージングし,標的分子の局在や遺伝子発現の情報とともに蓄積・解析するハイ コンテントスクリーニング (high-content screening; HCS) [157] も創薬や診断の場で重 要性を増しつつある.今後,本研究の成果を発展させた上でラボラトリオートメーション や HCS と統合することで,細胞実験からイメージング,動態の抽出と解析,そして生命 現象に関する知識発見までの一貫した自動化が可能となり,生物学,医学,薬学等の研究 を大幅に効率化し得ると期待される.

謝辞

本博士論文は,著者が平成31年4月から令和2年3月までの大阪大学大学院情報科学 研究科バイオ情報工学専攻博士前期課程在学中,および令和2年4月から現在までの同 博士後期課程在学中に取り組んだ細胞画像情報学に関する研究をまとめたものです.

本研究の全過程ならびに本博士論文の執筆にあたり,懇切丁寧かつ的確なご指導を賜り ました大阪大学大学院情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 松田秀雄 教授,瀬尾茂人 准 教授に厚く御礼申し上げます.本博士論文の審査委員として,丁寧なご指摘とご助言を賜 りました大阪大学大学院情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 松田史生 教授,小蔵正輝 准教授に深謝いたします.貴重なお時間を割いて丁寧なご教示を賜りました大阪大学大学 院情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 若宮直紀 教授,清水浩 教授,前田太郎 教授に感 謝いたします.

本研究の全過程において,様々なご助言とご協力を賜りました大阪大学大学院情報科学 研究科 バイオ情報工学専攻 繁田浩功 助教に感謝いたします.

本研究の遂行にあたり,有益なご意見を賜りました大阪大学サイバーメディアセンター 間下以大 准教授に感謝いたします.

第2章と第3章の研究で使用したイメージングデータは,大阪大学大学院医学系研究科 感染症・免疫学講座 免疫細胞生物学教室において取得されたものです.データをご提供 いただきました石井優 教授,菊田順一 准教授,内田穣 助教に心から感謝申し上げます.

第3章の研究に用いたプログラムコードの一部は,大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻ゲノム情報工学講座令和2年度博士前期課程修了生水垣翼様によって 作成されたものです.ご協力に深謝いたします.

本研究の全過程において,数え切れないほどのご尽力とご激励を賜りました大阪大学大 学院情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 ゲノム情報工学講座秘書 小林加代子様に厚く御 礼申し上げます.

本研究の遂行にあたり,様々なご協力を賜りました大阪大学大学院情報科学研究科 バ イオ情報工学専攻 ゲノム情報工学講座の学生の皆様に感謝いたします.特に,多大なる ご支援とご激励を賜りました森綾香様,長村徹様に厚く御礼申し上げます.

本研究の一部は,独立行政法人日本学術振興会 特別研究員制度の助成を受けて進めら れました.

参考文献

- T. Lechler and E. Fuchs. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, Vol. 437, No. 7056, pp. 275–280, 2005.
- [2] E. Israels and L. Israels. The cell cycle. The Oncologist, Vol. 5, No. 6, pp. 510–513, 2000.
- M. B. Kastan and J. Bartek. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, Vol. 432, No. 7015, pp. 316–323, 2004.
- [4] D. Dormann and C. J. Weijer. Imaging of cell migration. *EMBO Journal*, Vol. 25, No. 15, pp. 3480–3493, 2006.
- [5] K. M. Yamada and R. Mayor. Cell dynamics in development, tissue remodelling, and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 42, pp. iv–vi, 2016.
- [6] 中林秀和, 武田和久. 高分化型ヒト肝癌由来細胞株 "HuH-7". 岡山医学会雑誌, Vol. 124, No. 3, pp. 231–238, 2012.
- [7] B. Sainz Jr, N. Barretto, and S. L. Uprichard. Hepatitis C virus infection in phenotypically distinct Huh7 cell lines. *PLOS ONE*, Vol. 4, No. 8, p. e6561, 2009.
- [8] E. Sachs, A. M. Di Bisceglie, G. M. Dusheiko, E. Song, S. F. Lyons, B. D. Schoub, and M. C. Kew. Treatment of hepatocellular carcinoma with recombinant leucocyte interferon: A pilot study. *British Journal of Cancer*, Vol. 52, No. 1, pp. 105–109, 1985.
- [9] A. D. Luster, R. Alon, and U. H. v. Andrian. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, Vol. 6, No. 12, pp. 1182–1190, 2005.
- [10] D. Furman, J. Campisi, E. Verdin, P. Carrera-Bastos, S. Targ, C. Franceschi, L. Ferrucci, D. W. Gilroy, A. Fasano, G. W. Miller, A. H. Miller, A. Mantovani, C. M. Weyand, N. Barzilai, J. J. Goronzy, T. A. Rando, R. B. Effros, A. Lucia, N. Kleinstreuer, and G. M. Slavich. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, Vol. 25, No. 12, pp. 1822–1832, 2019.

- [11] A. Davidson and B. Diamond. Autoimmune diseases. New England Journal of Medicine, Vol. 345, No. 5, pp. 340–350, 2001.
- [12] A. B. Kay. Allergy and allergic diseases. New England Journal of Medicine, Vol. 344, No. 1, pp. 30–37, 2001.
- [13] C. R. Mackay. Moving targets: cell migration inhibitors as new antiinflammatory therapies. *Nature Immunology*, Vol. 9, No. 9, pp. 988–998, 2008.
- [14] A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa,
 S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa,
 H. Masai, and A. Miyawaki. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, Vol. 132, No. 3, pp. 487–498, 2008.
- [15] 水多陽子, 栗原大輔, 東山哲也. 2 光子顕微鏡による植物深部の in vivo イメージング. Plant Morphology, Vol. 26, No. 1, pp. 25–30, 2014.
- [16] 原口徳子, 木村宏, 平岡泰. 新・生細胞蛍光イメージング. 共立出版, 2015.
- [17] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, Vol. 9, No. 7, pp. 671–675, 2012.
- [18] B. Huang, M. Bates, and X. Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy. Annual Review of Biochemistry, Vol. 78, pp. 993–1016, 2009.
- [19] R. Pepperkok and J. Ellenberg. High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 7, No. 9, pp. 690–696, 2006.
- [20] H. Peng. Bioimage informatics: a new area of engineering biology. *Bioinfor*matics, Vol. 24, No. 17, pp. 1827–1836, 2008.
- [21] 内田誠一. バイオイメージ・インフォマティクス概要. 映像情報メディア学会誌, Vol. 67, No. 9, pp. 737–741, 2013.
- [22] E. Moen, D. Bannon, T. Kudo, W. Graf, M. Covert, and D. V. Valen. Deep learning for cellular image analysis. *Nature Methods*, Vol. 16, No. 12, pp. 1233– 1246, 2019.
- [23] E. Meijering. A bird's-eye view of deep learning in bioimage analysis. Computational and Structural Biotechnology Journal, Vol. 18, pp. 2312–2325, 2020.
- [24] M. Shifat-E-Rabbi, X. Yin, C. E. Fitzgerald, and G. K. Rohde. Cell image classification: A comparative overview. *Cytometry Part A*, Vol. 97, No. 4, pp.

347-362, 2020.

- [25] A. Alotaibi. Deep generative adversarial networks for image-to-image translation: A review. Symmetry, Vol. 12, No. 10, p. 1705, 2020.
- [26] I. A. Yusoff, N. A. M. Isa, N. H. Othman, S. N. Sulaiman, and Y. Jusman. Performance of neural network architectures: Cascaded MLP versus extreme learning machine on cervical cell image classification. In 10th International Conference on Information Science, Signal Processing and their Applications (ISSPA 2010), pp. 308–311, 2010.
- [27] G. Carneiro, T. Peng, C. Bayer, and N. Navab. Weakly-supervised structured output learning with flexible and latent graphs using high-order loss functions. In *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision* (ICCV), pp. 648–656, 2015.
- [28] C. L. Chen, A. Mahjoubfar, L.-C. Tai, I. K. Blaby, A. Huang, K. R. Niazi, and B. Jalali. Deep learning in label-free cell classification. *Scientific Reports*, Vol. 6, No. 1, pp. 1–16, 2016.
- [29] Z. Gao, L. Wang, L. Zhou, and J. Zhang. HEp-2 cell image classification with deep convolutional neural networks. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, Vol. 21, No. 2, pp. 416–428, 2016.
- [30] B. Jiang, X. Wang, J. Luo, X. Zhang, Y. Xiong, and H. Pang. Convolutional neural networks in automatic recognition of trans-differentiated neural progenitor cells under bright-field microscopy. In 2015 Fifth International Conference on Instrumentation and Measurement, Computer, Communication and Control (IMCCC), pp. 122–126, 2015.
- [31] L. Han and Z. Yin. Transferring microscopy image modalities with conditional generative adversarial networks. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) Workshops*, pp. 99–107, 2017.
- [32] M. E. Tschuchnig, G. J. Oostingh, and M. Gadermayr. Generative adversarial networks in digital pathology: A survey on trends and future potential. *Patterns*, Vol. 1, No. 6, p. 100089, 2020.
- [33] S. Liu, B. Zhang, Y. Liu, A. Han, H. Shi, T. Guan, and Y. He. Unpaired stain

transfer using pathology-consistent constrained generative adversarial networks. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 40, No. 8, pp. 1977–1989, 2021.

- [34] J. M. Wolterink, A. M. Dinkla, M. H. Savenije, P. R. Seevinck, C. A. van den Berg, and I. Išgum. Deep MR to CT synthesis using unpaired data. In *International Workshop on Simulation and Synthesis in Medical Imaging*, pp. 14–23, 2017.
- [35] H. Emami, M. Dong, S. P. Nejad-Davarani, and C. K. Glide-Hurst. SA-GAN: Structure-aware GAN for organ-preserving synthetic CT generation. In International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI) 2021, pp. 471–481, 2021.
- [36] E. Meijering. Cell segmentation: 50 years down the road. *IEEE Signal Processing Magazine*, Vol. 29, No. 5, pp. 140–145, 2012.
- [37] F. H. Araújo, R. R. Silva, D. M. Ushizima, M. T. Rezende, C. M. Carneiro, A. G. C. Bianchi, and F. N. Medeiros. Deep learning for cell image segmentation and ranking. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol. 72, pp. 13–21, 2019.
- [38] M. H. Hesamian, W. Jia, X. He, and P. Kennedy. Deep learning techniques for medical image segmentation: achievements and challenges. *Journal of Digital Imaging*, Vol. 32, No. 4, pp. 582–596, 2019.
- [39] C. Stringer, T. Wang, M. Michaelos, and M. Pachitariu. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, Vol. 18, No. 1, pp. 100– 106, 2021.
- [40] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox. U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI) 2015, pp. 234–241, 2015.
- [41] E. Meijering, O. Dzyubachyk, I. Smal, and W. A. van Cappellen. Tracking in cell and developmental biology. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol. 20, pp. 894–902, 2009.
- [42] E. Meijering, O. Dzyubachyk, and I. Smal. Methods for cell and particle tracking. *Methods in Enzymology*, Vol. 504, pp. 183–200, 2012.

- [43] S. Ye, Y. Yin, J. Yao, J. Nie, Y. Song, Y. Gao, J. Yu, H. Li, P. Fei, and W. Zheng. Axial resolution improvement of two-photon microscopy by multiframe reconstruction and adaptive optics. *Biomedical Optics Express*, Vol. 11, No. 11, pp. 6634–6648, 2020.
- [44] R. A. Hoebe, C. H. Van Oven, T. W. J. Gadella Jr, P. B. Dhonukshe, C. J. F. Van Noorden, and E. M. M. Manders. Controlled light-exposure microscopy reduces photobleaching and phototoxicity in fluorescence live-cell imaging. *Nature Biotechnology*, Vol. 25, No. 2, pp. 249–253, 2007.
- [45] R. Insall. The interaction between pseudopods and extracellular signalling during chemotaxis and directed migration. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 25, No. 5, pp. 526–531, 2013.
- [46] X. Yang, H. Li, and X. Zhou. Nuclei segmentation using marker-controlled watershed, tracking using mean-shift, and Kalman filter in time-lapse microscopy. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers*, Vol. 53, No. 11, pp. 2405–2414, 2006.
- [47] M. J. Downey, D. M. Jeziorska, S. Ott, T. K. Tamai, G. Koentges, K. W. Vance, and T. Bretschneider. Extracting fluorescent reporter time courses of cell lineages from high-throughput microscopy at low temporal resolution. *PLOS ONE*, Vol. 6, No. 12, pp. 1–12, 2011.
- [48] H. Shigeta, S. Seno, S. Nishizawa, Y. Uchida, J. Kikuta, M. Ishii, and H. Matsuda. Analyzing leukocyte migration trajectories by deformable image matching. In *IEEE 19th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*, pp. 94–98, 2019.
- [49] J.-B. Lugagne, H. Lin, and M. J. Dunlop. DeLTA: Automated cell segmentation, tracking, and lineage reconstruction using deep learning. *PLOS Computational Biology*, Vol. 16, No. 4, pp. 1–18, 2020.
- [50] P. K. Andersen and N. Keiding. Multi-state models for event history analysis. Statistical Methods in Medical Research, Vol. 11, No. 2, pp. 91–115, 2002.
- [51] 佐谷秀行.細胞周期制御異常による発癌および悪性化機構. Skin Cancer, Vol. 19, No. 3, pp. 281–286, 2005.
- [52] B. Barlogie, M. N. Raber, J. Schumann, T. S. Johnson, B. Drewinko, D. E.

Swartzendruber, W. Göhde, M. Andreeff, and E. J. Freireich. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research*, Vol. 43, No. 9, pp. 3982–3997, 1983.

- [53] 瀬尾茂人, 間下以大, 前田栄, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄. 混合正規分布モデルを用いた経時観測蛍光画像からの細胞核の検出と追跡手法. 情報処理学会論文誌 数理モデル化と応用 (TOM), Vol. 6, No. 3, pp. 140–150, 2013.
- [54] N. Zielke and B. Edgar. FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, Vol. 4, No. 5, pp. 469–487, 2015.
- [55] Clarivate. Web of Science. https://www.webofscience.com/wos/woscc/ basic-search.
- [56] A. Sakaue-Sawano, T. Kobayashi, K. Ohtawa, and A. Miyawaki. Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biology*, Vol. 12, No. 1, p. 2, 2011.
- [57] P. Kleiblova, I. A. Shaltiel, J. Benada, J. Ševčík, S. Pecháčková, P. Pohlreich, E. E. Voest, P. Dundr, J. Bartek, Z. Kleibl, R. H. Medema, and L. Macurek. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *Journal of Cell Biology*, Vol. 201, No. 4, pp. 511–521, 2013.
- [58] S. Maeda, H. Wada, Y. Naito, H. Nagano, S. Simmons, Y. Kagawa, A. Naito, J. Kikuta, T. Ishii, Y. Tomimaru, N. Hama, K. Kawamoto, S. Kobayashi, H. Eguchi, K. Umeshita, H. Ishii, Y. Doki, M. Mori, and M. Ishii. Interferon-α acts on the S/G2/M phases to induce apoptosis in the G1 phase of an IFNAR2expressing hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 289, No. 34, pp. 23786–23795, 2014.
- [59] S. Yano, S. Miwa, S. Mii, Y. Hiroshima, F. Uehara, M. Yamamoto, H. Kishimoto, H. Tazawa, M. Bouvet, T. Fujiwara, and R. M. Hoffman. Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle*, Vol. 13, No. 6, pp. 953–960, 2014.
- [60] D. Coronado, M. Godet, P.-Y. Bourillot, Y. Tapponnier, A. Bernat, M. Petit, M. Afanassieff, S. Markossian, A. Malashicheva, R. Iacone, K. Anastassiadis,

and P. Savatier. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research*, Vol. 10, No. 1, pp. 118–131, 2013.

- [61] M. Roccio, D. Schmitter, M. Knobloch, Y. Okawa, D. Sage, and M. P. Lutolf. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development*, Vol. 140, No. 2, pp. 459–470, 2013.
- [62] Y. Ogura, A. Sakaue-Sawano, M. Nakagawa, N. Satoh, A. Miyawaki, and Y. Sasakura. Coordination of mitosis and morphogenesis: role of a prolonged G2 phase during chordate neurulation. *Development*, Vol. 138, No. 3, pp. 577–587, 2011.
- [63] C. M. Bouldin, C. D. Snelson, G. H. Farr, and D. Kimelman. Restricted expression of cdc25a in the tailbud is essential for formation of the zebrafish posterior body. *Genes & Development*, Vol. 28, No. 4, pp. 384–395, 2014.
- [64] T. Davoli, E. L. Denchi, and T. d. Lange. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*, Vol. 141, No. 1, pp. 81–93, 2010.
- [65] N. J. Ganem, H. Cornils, S.-Y. Chiu, K. P. O'Rourke, J. Arnaud, D. Yimlamai, M. Théry, F. D. Camargo, and D. Pellman. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell*, Vol. 158, No. 4, pp. 833–848, 2014.
- [66] J. Humeau, J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, L. Nunez, C. Villalobos, G. Kroemer, and L. Senovilla. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium*, Vol. 70, pp. 3–15, 2018.
- [67] H. K. Matthews, C. Bertoli, and R. A. d. Bruin. Cell cycle control in cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Vol. 23, No. 1, pp. 74–88, 2022.
- [68] A. Sakaue-Sawano, M. Yo, N. Komatsu, T. Hiratsuka, T. Kogure, T. Hoshida, N. Goshima, M. Matsuda, H. Miyoshi, and A. Miyawaki. Genetically encoded tools for optical dissection of the mammalian cell cycle. *Molecular Cell*, Vol. 68, No. 3, pp. 626–640.e5, 2017.
- [69] V. V. Didenko. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, Vol. 31, No. 5, pp. 1106– 1121, 2001.
- [70] L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, and S. Zhu. FRET-based small-molecule fluorescent probes: Rational design and bioimaging applications. Accounts of Chemical

Research, Vol. 46, No. 7, pp. 1462–1473, 2013.

- [71] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, and A. Miyawaki. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 99, No. 20, pp. 12651–12656, 2002.
- [72] R. Ando, H. Mizuno, and A. Miyawaki. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, Vol. 306, No. 5700, pp. 1370–1373, 2004.
- [73] J. Munkres. Algorithms for the assignment and transportation problems. Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics, Vol. 5, No. 1, pp. 32–38, 1957.
- [74] M. S. Arulampalam, S. Maskell, N. Gordon, and T. Clapp. A tutorial on particle filters for online nonlinear/non-gaussian bayesian tracking. *IEEE Transactions* on Signal Processing, Vol. 50, No. 2, pp. 174–188, 2002.
- [75] K. Meshgi, S. i. Maeda, S. Oba, H. Skibbe, Y. Li, and S. Ishii. An occlusionaware particle filter tracker to handle complex and persistent occlusions. *Computer Vision and Image Understanding*, Vol. 150, pp. 81–94, 2016.
- [76] 矢野浩一. 粒子フィルタの基礎と応用:フィルタ・平滑化・パラメータ推定. 日本 統計学会誌, Vol. 44, No. 1, pp. 189–216, 2014.
- [77] L. Yuan, Y. F. Zheng, J. Zhu, L. Wang, and A. Brown. Object tracking with particle filtering in fluorescence microscopy images: Application to the motion of neurofilaments in axons. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, Vol. 31, No. 1, pp. 117–130, 2012.
- [78] O. Hirose, S. Kawaguchi, T. Tokunaga, Y. Toyoshima, T. Teramoto, S. Kuge, T. Ishihara, Y. Iino, and R. Yoshida. SPF-CellTracker: Tracking multiple cells with strongly-correlated moves using a spatial particle filter. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, Vol. 15, No. 6, pp. 1822– 1831, 2018.
- [79] D. J. Lew, N. J. Marini, and S. I. Reed. Different G cyclins control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast S. cerevisiae. *Cell*, Vol. 69, No. 2, pp. 317–327, 1992.

- [80] M. Ricicova, M. Hamidi, A. Quiring, A. Niemistö, E. Emberly, and C. L. Hansen. Dissecting genealogy and cell cycle as sources of cell-to-cell variability in mapk signaling using high-throughput lineage tracking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 110, No. 28, pp. 11403–11408, 2013.
- [81] X. Hu, A. E. Eastman, and S. Guo. Cell cycle dynamics in the reprogramming of cellular identity. *FEBS Letters*, Vol. 593, No. 20, pp. 2840–2852, 2019.
- [82] R. Maini and H. Aggarwal. Study and comparison of various image edge detection techniques. *International Journal of Image Processing (IJIP)*, Vol. 3, No. 1, pp. 1–11, 2009.
- [83] K. Bernardin and R. Stiefelhagen. Evaluating multiple object tracking performance: the CLEAR MOT metrics. EURASIP Journal on Image and Video Processing, Vol. 2008, pp. 1–10, 2008.
- [84] R. Stiefelhagen and J. Garofolo. Multimodal technologies for perception of humans. In First International Evaluation Workshop on Classification of Events, Activities and Relationships, CLEAR 2006, Revised Selected Papers, Vol. 4122, 2007.
- [85] B. Wu and R. Nevatia. Tracking of multiple, partially occluded humans based on static body part detection. In *IEEE Computer Society Conference on Computer* Vision and Pattern Recognition (CVPR), pp. 951–958, 2006.
- [86] C. Heindl. py-motmetrics: Benchmark multiple object trackers (MOT) in Python. https://github.com/cheind/py-motmetrics.
- [87] H. O. Lee, J. M. Davidson, and R. J. Duronio. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development*, Vol. 23, No. 21, pp. 2461–2477, 2009.
- [88] J. A. Hickman. Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer and Metastasis Reviews, Vol. 11, No. 2, pp. 121–139, 1992.
- [89] J. P. Klein and M. L. Moeschberger. Survival Analysis: Techniques for Censored and Truncated Data. Springer Science & Business Media, 2006.
- [90] N. Ferguson, S. Datta, and G. Brock. msSurv: An R package for nonparametric estimation of multistate models. *Journal of Statistical Software*, Vol. 50, No. 14, pp. 1–24, 2012.
- [91] H. Ota, H. Nagano, M. Sakon, H. Eguchi, M. Kondo, T. Yamamoto,

M. Nakamura, B. Damdinsuren, H. Wada, S. Marubashi, A. Miyamoto, K. Dono, K. Umeshita, S. Nakamori, K. Wakasa, and M. Monden. Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon- α and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type 1 interferon receptor expression. *British Journal of Cancer*, Vol. 93, No. 5, pp. 557–564, 2005.

- [92] S. Obi, H. Yoshida, R. Toune, T. Unuma, M. Kanda, S. Sato, R. Tateishi, T. Teratani, S. Shiina, and M. Omata. Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer*, Vol. 106, No. 9, pp. 1990–1997, 2006.
- [93] M. Kondo, H. Nagano, H. Wada, B. Damdinsuren, H. Yamamoto, N. Hiraoka, H. Eguchi, A. Miyamoto, T. Yamamoto, H. Ota, M. Nakamura, S. Marubashi, K. Dono, K. Umeshita, S. Nakamori, M. Sakon, and M. Monden. Combination of IFN-α and 5-fluorouracil induces apoptosis through IFN-α/β receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, Vol. 11, No. 3, pp. 1277–1286, 2005.
- [94] E. Manchado, M. Guillamot, and M. Malumbres. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death & Differentiation*, Vol. 19, No. 3, pp. 369–377, 2012.
- [95] S. McArdle, K. Buscher, Y. Ghosheh, A. B. Pramod, J. Miller, H. Winkels, D. Wolf, and K. Ley. Migratory and dancing macrophage subsets in atherosclerotic lesions. *Circulation Research*, Vol. 125, No. 12, pp. 1038–1051, 2019.
- [96] K. Miyake and T. Kaisho. Homeostatic inflammation in innate immunity. Current Opinion in Immunology, Vol. 30, pp. 85–90, 2014.
- [97] T. R. Mempel, S. E. Henrickson, and U. H. von Andrian. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, Vol. 427, No. 6970, pp. 154–159, 2004.
- [98] M. H. Andersen, D. Schrama, P. thor Straten, and J. C. Becker. Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 126, No. 1, pp. 32–41, 2006.
- [99] 嶋田彩人, 瀬尾茂人, 繁田浩功, 間下以大, 内田穣, 石井優, 松田秀雄. 生体蛍光観察 動画像の深度を考慮した深層学習による細胞追跡精度の改善. 情報処理学会論文誌

数理モデル化と応用 (TOM), Vol. 12, No. 2, pp. 82-91, 2019.

- [100] 中辻憲夫. 胚形成と細胞運動 特に両生類の原腸形成運動. 生物物理, Vol. 26, No. 3, pp. 101–109, 1986.
- [101] M. J. Pittet and R. Weissler. Intravital imaging. *Cell*, Vol. 147, No. 5, pp. 983–991, 2011.
- [102] R. K. P. Benninger and D. W. Piston. Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Current Protocols in Cell Biology*, Vol. 59, No. 1, pp. 4.11.1–4.11.24, 2013.
- [103] W. Göbel, B. M. Kampa, and F. Helmchen. Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning. *Nature Methods*, Vol. 4, No. 1, pp. 73–79, 2007.
- [104] R. G. Nava, W. Li, A. E. Gelman, A. S. Krupnick, M. J. Miller, and D. Kreisel. Two-photon microscopy in pulmonary research. In *Seminars in Immunopathol*ogy, Vol. 32, pp. 297–304, 2010.
- [105] S. Celli, M. L. Albert, and P. Bousso. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nature Medicine*, Vol. 17, No. 6, pp. 744–749, 2011.
- [106] M. Kolesnikov, J. Farache, and G. Shakhar. Intravital two-photon imaging of the gastrointestinal tract. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 421, pp. 73–80, 2015.
- [107] J. Condeelis and J. E. Segall. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 3, No. 12, pp. 921–930, 2003.
- [108] D. Kedrin, B. Gligorijevic, J. Wyckoff, V. V. Verkhusha, J. Condeelis, J. E. Segall, and J. Van Rheenen. Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window. *Nature Methods*, Vol. 5, No. 12, pp. 1019–1021, 2008.
- [109] S. Pinner and E. Sahai. Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. Journal of Microscopy, Vol. 231, No. 3, pp. 441–445, 2008.
- [110] E. T. Roussos, J. S. Condeelis, and A. Patsialou. Chemotaxis in cancer. Nature Reviews Cancer, Vol. 11, No. 8, pp. 573–587, 2011.
- [111] M. Furuya, J. Kikuta, S. Fujimori, S. Seno, H. Maeda, M. Shirazaki, M. Uenaka,

H. Mizuno, Y. Iwamoto, A. Morimoto, K. Hashimoto, T. Ito, Y. Isogai,
M. Kashii, T. Kaito, S. Ohba, U. Chung, A. C. Lichtler, K. Kikuchi, H. Matsuda,
H. Yoshikawa, and M. Ishii. Direct cell-cell contact between mature osteoblasts
and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo. *Nature Communications*, Vol. 9, No. 1, pp. 1–12, 2018.

- [112] K. Nishikawa, S. Seno, T. Yoshihara, A. Narazaki, Y. Sugiura, R. Shimizu, J. Kikuta, R. Sakaguchi, N. Suzuki, N. Takeda, H. Semba, M. Yamamoto, D. Okuzaki, D. Motooka, Y. Kobayashi, M. Suematsu, H. Koseki, H. Matsuda, M. Yamamoto, S. Tobita, Y. Mori, and M. Ishii. Osteoclasts adapt to physioxia perturbation through DNA demethylation. *EMBO Reports*, Vol. 22, No. 12, p. e53035, 2021.
- [113] R. Matsuura, S. Miyagawa, S. Fukushima, T. Goto, A. Harada, Y. Shimozaki, K. Yamaki, S. Sanami, J. Kikuta, M. Ishii, and Y. Sawa. Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischeamia-reperfused rat heart. *Scientific Reports*, Vol. 8, No. 1, pp. 1–9, 2018.
- [114] F. Schmerse, K. Woidacki, M. Riek-Burchardt, P. Reichardt, A. Roers, C. Tadokoro, and A. C. Zenclussen. In vivo visualization of uterine mast cells by two-photon microscopy. *Reproduction*, Vol. 147, No. 6, pp. 781–788, 2014.
- [115] S. Bardehle, M. Krüger, F. Buggenthin, J. Schwausch, J. Ninkovic, H. Clevers, H. J. Snippert, F. J. Theis, M. Meyer-Luehmann, I. Bechmann, L. Dimou, and M. Götz. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience*, Vol. 16, No. 5, pp. 580–586, 2013.
- [116] P. R. Williams, B.-N. Marincu, C. D. Sorbara, C. F. Mahler, A.-M. Schumacher, O. Griesbeck, M. Kerschensteiner, and T. Misgeld. A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion in vivo. *Nature Communications*, Vol. 5, No. 1, pp. 1–11, 2014.
- [117] I. M. Schießl and H. Castrop. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, Vol. 468, No. 9, pp. 1505–1516, 2016.
- [118] J. F. Dekkers, M. Alieva, L. M. Wellens, H. C. R. Ariese, P. R. Jamieson, A. M.

Vonk, G. D. Amatngalim, H. Hu, K. C. Oost, H. J. G. Snippert, J. M. Beekman, E. J. Wehrens, J. E. Visvader, H. Clevers, and A. C. Rios. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nature Protocols*, Vol. 14, No. 6, pp. 1756–1771, 2019.

- [119] I. Rakotoson, B. Delhomme, P. Djian, A. Deeg, M. Brunstein, C. Seebacher, R. Uhl, C. Ricard, and M. Oheim. Fast 3-D imaging of brain organoids with a new single-objective planar-illumination two-photon microscope. *Frontiers in Neuroanatomy*, Vol. 13, p. 77, 2019.
- [120] I. Goodfellow, Y. Bengio, and A. Courville. *Deep Learning*. MIT Press, 2016.
- [121] G. Ciaparrone, F. L. Sánchez, S. Tabik, L. Troiano, R. Tagliaferri, and F. Herrera. Deep learning in video multi-object tracking: A survey. *Neuro*computing, Vol. 381, pp. 61–88, 2020.
- [122] H. Nam and B. Han. Learning multi-domain convolutional neural networks for visual tracking. In Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), pp. 4293–4302, 2016.
- [123] T. He, H. Mao, J. Guo, and Z. Yi. Cell tracking using deep neural networks with multi-task learning. *Image and Vision Computing*, Vol. 60, pp. 142–153, 2017.
- [124] D. E. Hernandez, S. W. Chen, E. E. Hunter, E. B. Steager, and V. Kumar. Cell tracking with deep learning and the viterbi algorithm. In 2018 International Conference on Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales (MARSS), pp. 1–6, 2018.
- [125] H. Hu, L. Zhou, Q. Guan, Q. Zhou, and S. Chen. An automatic tracking method for multiple cells based on multi-feature fusion. *IEEE Access*, Vol. 6, pp. 69782–69793, 2018.
- [126] J. Hayashida, K. Nishimura, and R. Bise. MPM: Joint representation of motion and position map for cell tracking. In *Proceedings of the IEEE/CVF Conference* on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), pp. 3823–3832, 2020.
- [127] H.-F. Tsai, J. Gajda, T. F. Sloan, A. Rares, and A. Q. Shen. Usiigaci: Instanceaware cell tracking in stain-free phase contrast microscopy enabled by machine learning. *SoftwareX*, Vol. 9, pp. 230–237, 2019.

- [128] S. Ji, W. Xu, M. Yang, and K. Yu. 3D convolutional neural networks for human action recognition. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 35, No. 1, pp. 221–231, 2012.
- [129] L. Wang, W. Li, W. Li, and L. Van Gool. Appearance-and-relation networks for video classification. In *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, pp. 1430–1439, 2018.
- [130] D. Tran, L. Bourdev, R. Fergus, L. Torresani, and M. Paluri. Deep end2end voxel2voxel prediction. In Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR) Workshops, pp. 17–24, 2016.
- [131] O. Çiçek, A. Abdulkadir, S. S. Lienkamp, T. Brox, and O. Ronneberger. 3D U-Net: learning dense volumetric segmentation from sparse annotation. In International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI) 2016, pp. 424–432, 2016.
- [132] L. Fan, Z. Wang, B. Cail, C. Tao, Z. Zhang, Y. Wang, S. Li, F. Huang, S. Fu, and F. Zhang. A survey on multiple object tracking algorithm. In 2016 IEEE International Conference on Information and Automation (ICIA), pp. 1855– 1862, 2016.
- [133] Y. Sato, N. Shiraga, S. Nakajima, S. Tamura, and R. Kikinis. Local maximum intensity projection (LMIP): A new rendering method for vascular visualization. *Journal of Computer Assisted Tomography*, Vol. 22, No. 6, pp. 912–917, 1998.
- [134] S. Ren, K. He, R. Girshick, and J. Sun. Faster R-CNN: Towards real-time object detection with region proposal networks. In Advances in Neural Information Processing Systems, Vol. 28, 2015.
- [135] A. Paszke, S. Gross, F. Massa, A. Lerer, J. Bradbury, G. Chanan, T. Killeen, Z. Lin, N. Gimelshein, L. Antiga, A. Desmaison, A. Kopf, E. Yang, Z. DeVito, M. Raison, A. Tejani, S. Chilamkurthy, B. Steiner, L. Fang, J. Bai, and S. Chintala. PyTorch: An imperative style, high-performance deep learning library. In Advances in Neural Information Processing Systems, Vol. 32, pp. 8024–8035. 2019.
- [136] R. Girshick, J. Donahue, T. Darrell, and J. Malik. Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation. In *Proceedings of the*

IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), pp. 580–587, 2014.

- [137] M. J. Miller, O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *Journal* of Experimental Medicine, Vol. 200, No. 7, pp. 847–856, 2004.
- [138] J. B. Beltman, A. F. Marée, and R. J. D. Boer. Analysing immune cell migration. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 9, pp. 789–798, 2009.
- [139] X. Liu, S. Yin, Y. Chen, Y. Wu, W. Zheng, H. Dong, Y. Bai, Y. Qin, J. Li, S. Feng, and P. Zhao. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF-κb, STAT3 or AP-1 activation. *Molecular Medicine Reports*, Vol. 17, No. 4, pp. 5484–5491, 2018.
- [140] A. J. Fleetwood, T. Lawrence, J. A. Hamilton, and A. D. Cook. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *The Journal* of Immunology, Vol. 178, No. 8, pp. 5245–5252, 2007.
- [141] S. N. Chang, D. K. Dey, S. T. Oh, W. H. Kong, K. H. Cho, E. M. Al-Olayan, B. S. Hwang, S. C. Kang, and J. G. Park. Phorbol 12-myristate 13-acetate induced toxicity study and the role of tangeretin in abrogating HIF-1α-NF-κB crosstalk in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21, No. 23, p. 9261, 2020.
- [142] Y. D. Heryanto, C.-Y. Cheng, Y. Uchida, K. Mimura, M. Ishii, and R. Yamada. Integrated analysis of cell shape and movement in moving frame. *Biology Open*, Vol. 10, No. 3, 2021.
- [143] J. Gibson and O. Marques. Optical Flow and Trajectory Estimation Methods. Springer, 2016.
- [144] R. A. Hamzah and H. Ibrahim. Literature survey on stereo vision disparity map algorithms. *Journal of Sensors*, Vol. 2016, 2016.
- [145] A. Kolb, E. Barth, R. Koch, and R. Larsen. Time-of-Flight cameras in computer graphics. In *Computer Graphics Forum*, Vol. 29, pp. 141–159, 2010.
- [146] A. Mertan, D. J. Duff, and G. Unal. Single image depth estimation: An

overview. Digital Signal Processing, p. 103441, 2022.

- [147] S. Noorzai and C. J. Verbeek. Collagen: From waste to gold. In *Biotechnological Applications of Biomass*. IntechOpen, 2020.
- [148] 榎並淳平. コラーゲン・ゲル・マトリックスを利用した細胞培養法. 繊維学会誌,
 Vol. 42, No. 6, pp. 222–225, 1986.
- [149] C. M. Svensson, A. Medyukhina, I. Belyaev, N. Al-Zaben, and M. T. Figge. Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis. *Cytometry Part A*, Vol. 93, pp. 357–370, 2018.
- [150] M. Ingaramo, A. G. York, P. Wawrzusin, O. Milberg, A. Hong, R. Weigert,
 H. Shroff, and G. H. Patterson. Two-photon excitation improves multifocal structured illumination microscopy in thick scattering tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 111, No. 14, pp. 5254–5259, 2014.
- [151] U. Böhm, S. W. Hell, and R. Schmidt. 4Pi-RESOLFT nanoscopy. Nature Communications, Vol. 7, No. 1, pp. 1–8, 2016.
- [152] W. Zheng, Y. Wu, P. Winter, R. Fischer, D. D. Nogare, A. Hong, C. McCormick, R. Christensen, W. P. Dempsey, D. B. Arnold, J. Zimmerberg, A. Chitnis, J. Sellers, C. Waterman, and H. Shroff. Adaptive optics improves multiphoton super-resolution imaging. *Nature Methods*, Vol. 14, No. 9, pp. 869–872, 2017.
- [153] Y. Kagawa, S. Matsumoto, Y. Kamioka, K. Mimori, Y. Naito, T. Ishii,
 D. Okuzaki, N. Nishida, S. Maeda, A. Naito, J. Kikuta, K. Nishikawa,
 J. Nishimura, N. Haraguchi, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda,
 H. Yamamoto, M. Sekimoto, H. Ishii, Y. Doki, M. Matsuda, A. Kikuchi,
 M. Mori, and M. Ishii. Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLOS ONE*, Vol. 8, No. 12, p. e83629, 2013.
- [154] P. Friedl, K. S. Zänker, and E.-B. Bröcker. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microscopy Research and Technique*, Vol. 43, No. 5, pp. 369– 378, 1998.
- [155] D.-H. Kim and D. Wirtz. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *The FASEB Journal*, Vol. 27, No. 4, pp. 1351–1361, 2013.

- [156] T. D. Itoh, T. Horinouchi, H. Uchida, K. Takahashi, and H. Ozaki. Optimal scheduling for laboratory automation of life science experiments with time constraints. *SLAS Technology*, Vol. 26, pp. 650–659, 2021.
- [157] M. M. Usaj, E. B. Styles, A. J. Verster, H. Friesen, C. Boone, and B. J. Andrews. High-content screening for quantitative cell biology. *Trends in Cell Biology*, Vol. 26, No. 8, pp. 598–611, 2016.