

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

バイオイメーキ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, 細胞を生きのまま観察し, 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) で実際にはたらいっ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う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反応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。

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
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	8
2.1 緒言	8
2.2 細胞周期と Fucci	9
2.2.1 細胞周期解析の重要性	9
2.2.2 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 of 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 考察	35
2.7 提案手法を用いた細胞周期解析	38
2.8 結言	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	細胞遊走	44
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	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	深層学習に基づく細胞追跡	47
3.4.2	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	概要	52
3.5.2	細胞追跡の方法	53
3.5.3	MDNetの訓練方法	55
3.6	評価実験	56
3.6.1	実験方法	56
3.6.2	結果	58
3.6.3	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	72

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

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

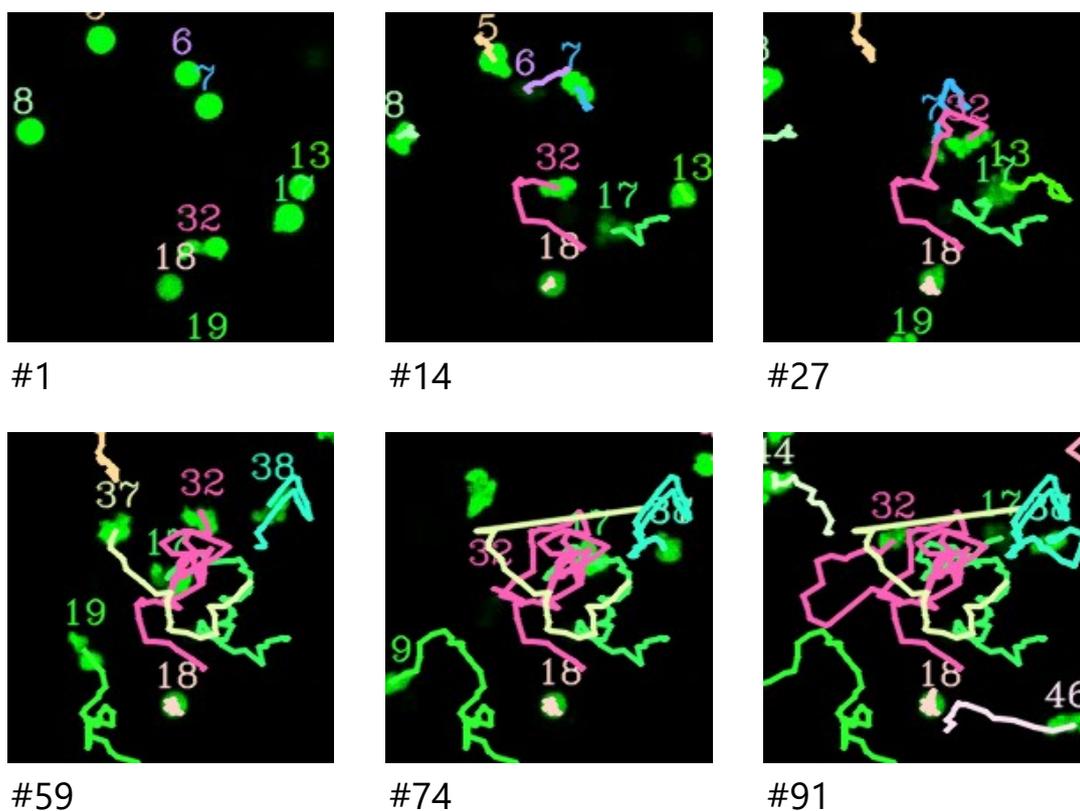


図 1.1 細胞追跡の例 (緑色蛍光タンパク質で可視化された好中球の追跡)

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、互いに押し合いながら移動・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化したのか，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 inhibitor) 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

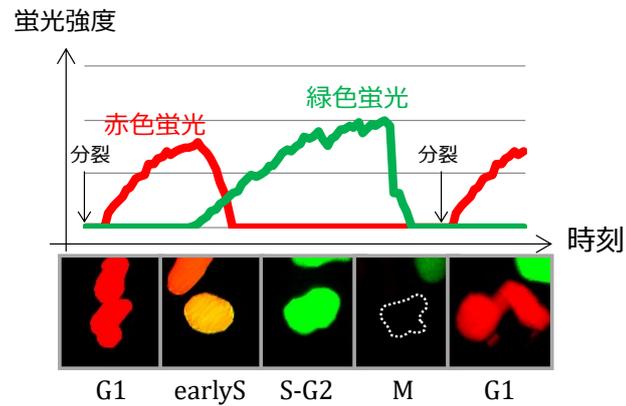


図 2.1 Fucci による細胞周期進行の可視化 (瀬尾ら [53] の図 1 (b) を改変)

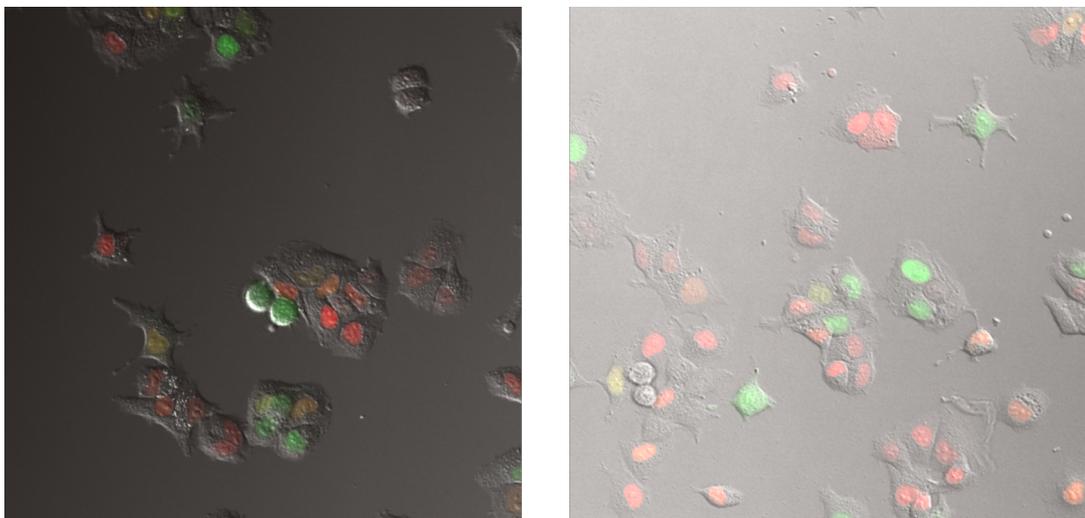


図 2.2 Fucci 導入細胞のイメージングデータの例

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わる光変換 (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

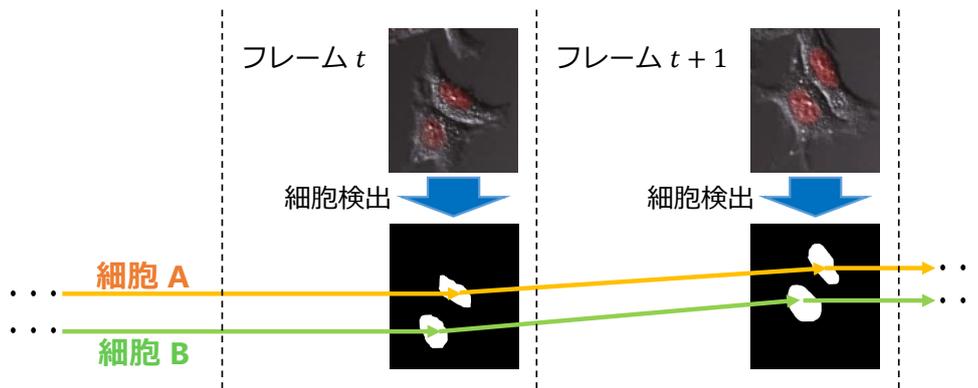


図 2.3 検出と対応付けに基づく細胞追跡手法

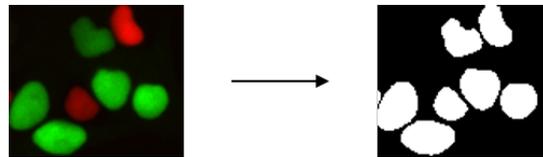
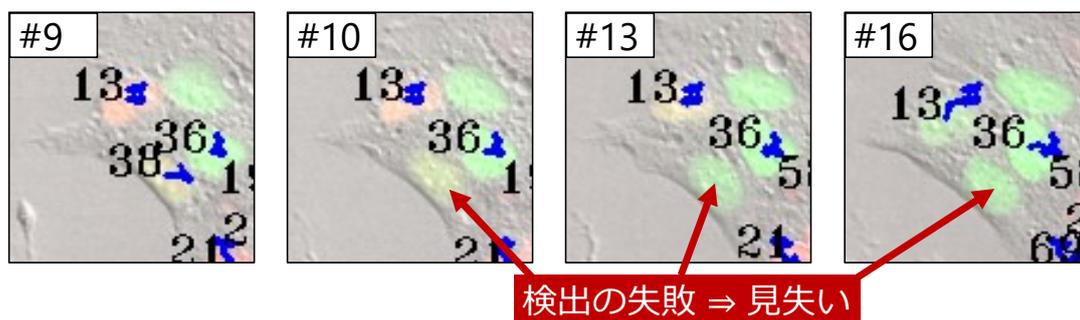


図 2.4 セグメンテーションの例

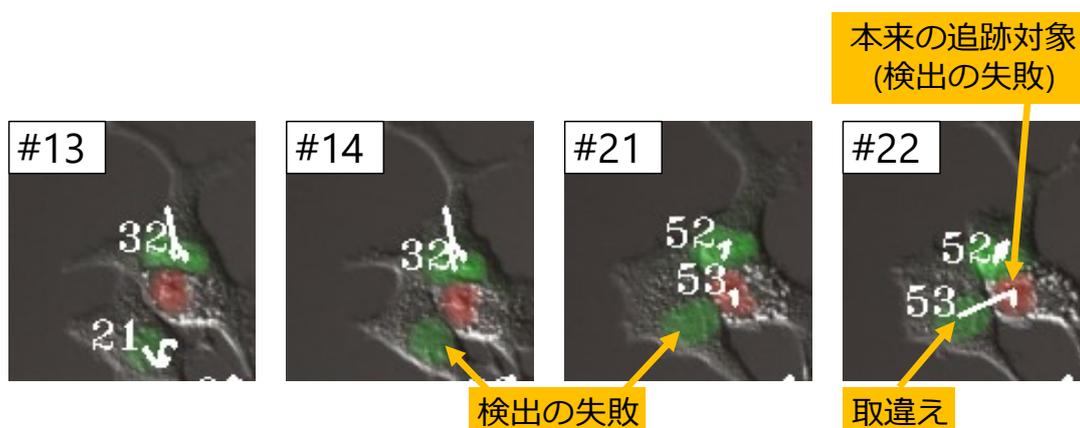
あるが、細胞が密集している場合や撮影間隔が大きい場合に異なる細胞同士を対応付けてしまう可能性が高い。そのため領域の色やサイズ、輪郭等の様々な特徴が類似度の計算に利用されている。

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 (追跡対象の取違い)。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



(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い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い (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 $\mathbf{x}_t^{(1)}, \dots, \mathbf{x}_t^{(n)}$ 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 \mathbf{x}_t を、尤度で重み付けされたパーティクルの平均位置

$$\mathbf{x}_t = \frac{1}{L} \sum_{1 \leq i \leq n} l_t^{(i)} \mathbf{x}_t^{(i)} \quad (2.1)$$

として推定する。ただし L は尤度の総和

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

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 \mathbf{Y}_t で条件付けられた \mathbf{x}_t の事後分布 $p(\mathbf{x}_t | \mathbf{Y}_t)$ 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 \mathbf{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 ($\mathbf{x}_1^{(1)} = \dots = \mathbf{x}_1^{(n)} = \mathbf{x}_1$)。続いて、各 t 番目のフレーム ($t \geq 2$) 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 $\mathbf{x}_{t-1}^{(1)}, \dots, \mathbf{x}_{t-1}^{(n)}$ 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 $p(\mathbf{x}_t^{(i)} | \mathbf{x}_{t-1}^{(i)})$ に従って各パーティクル $\mathbf{x}_{t-1}^{(1)}, \dots, \mathbf{x}_{t-1}^{(n)}$ を移動させ、新しいパーティクル $\mathbf{x}_t^{(1)}, \dots, \mathbf{x}_t^{(n)}$ とする。このモデルはシステムモデル (system model) と呼ばれる。

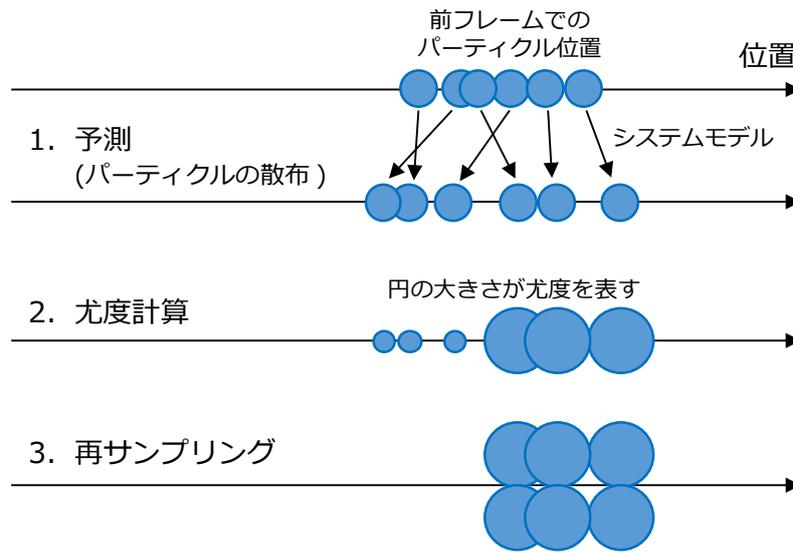


図 2.6 パーティクルフィルタ法による追跡対象の検出

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 $\{x_t^{(1)}, \dots, x_t^{(n)}\}$ から, 尤度 $l_t^{(1)}, \dots, l_t^{(n)}$ に比例する確率に従って n 個を復元抽出し, あらためて $x_t^{(1)}, \dots, x_t^{(n)}$ 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 (タイムラプス画像系列) 内に出現する細胞を追跡する。入力動画は N 枚のフレーム I_1, \dots, 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ンネル (グレースケール画像)、緑色蛍光を可視化したチャンネル、ならびに微分干渉顕微鏡で撮影されたチャンネル (DIC チャンネル) 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。入力動画の例は図 2.2 に示されている。出力は動画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ンネルの平滑化^{*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

^{*2} 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。

^{*3} 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。

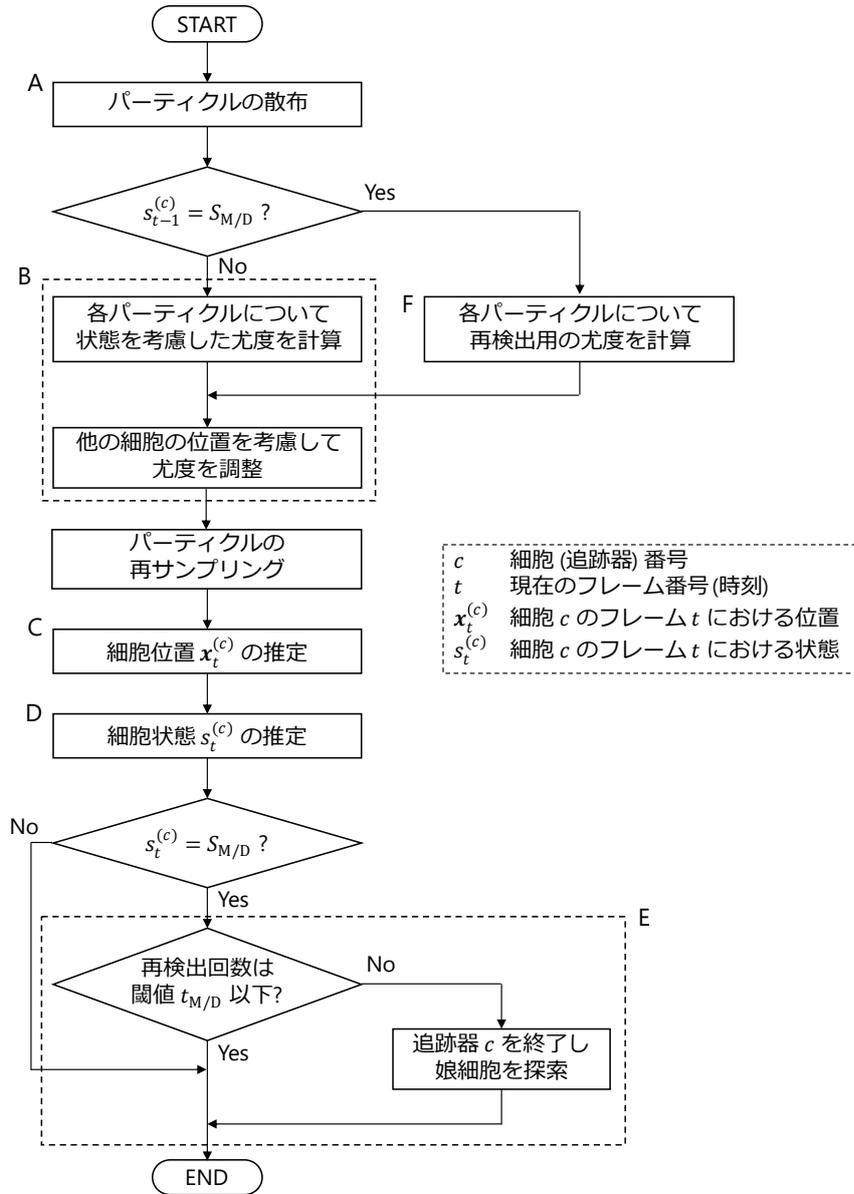


図 2.7 提案手法における細胞の検出手順

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 $\mathbf{x}_{t-1}^{(c,i)}$ とすると、現フレーム I_t ではそのパーティクルを

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

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。

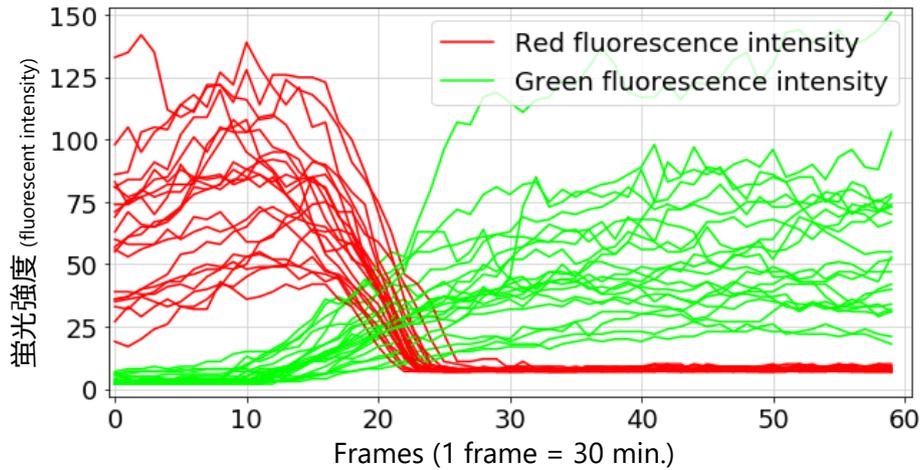


図 2.8 Fucci の蛍光強度の経時変化

- 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, 青チャンネルの輝度を表す) の色相 h は次式で定義される。

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

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 と g として青色

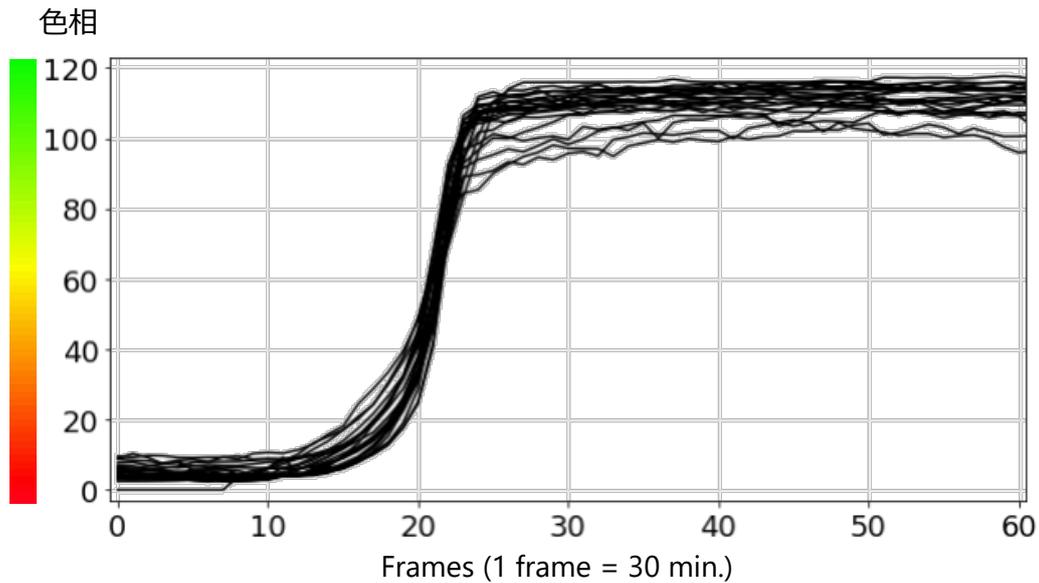


図 2.9 Fucci の色相の変化 (図 2.8 に対応)

チャンネルの輝度は 0 とすると，式 2.4 は

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

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

$$v = \max(r, g, b) = \max(r, g) \quad (2.6)$$

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.

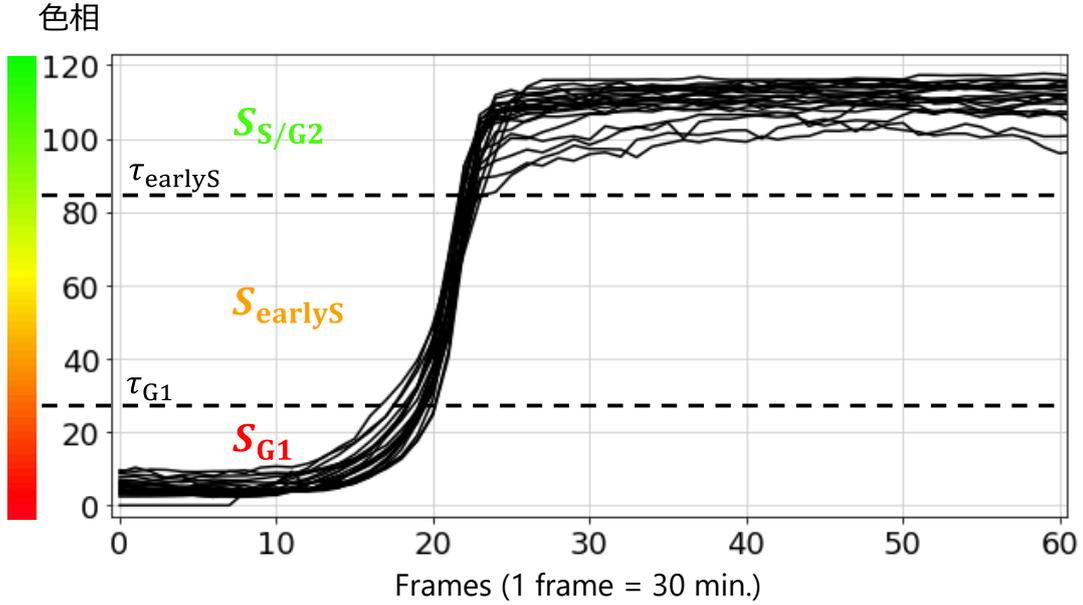


図 2.10 色相に基づく状態推定

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。

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

ただし τ_{value} は状態 $S_{M/D}$ 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。 $\tau_{G1}, \tau_{\text{earlyS}}$ 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 $S_{G1}, S_{\text{earlyS}}, S_{S/G2}$ 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。

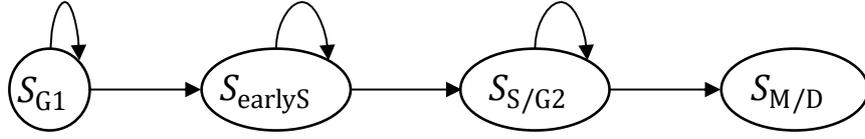


図 2.11 提案手法の想定する状態変化

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 $\mathbf{x}_{t-1}^{(c)}$ と現フレーム I_t における当該パーティクル i の位置 $\mathbf{x}_t^{(c,i)}$ 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、 $f_{\text{hue}}(\Delta h | s)$ 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、 $f_{\text{disappear}}(v)$ 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。

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

ただし

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

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

e_{state} は式 2.7 で定義された状態推定関数, $h(I, \mathbf{x})$ と $v(I, \mathbf{x})$ はそれぞれ画像 I の位置 \mathbf{x} における色相と明度である. $0 \leq \alpha \leq 1$ 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, $S_{G1}, S_{S/G2}$ 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 $s \in \{S_{G1}, S_{\text{earlyS}}, S_{S/G2}\}$ 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 ($1 \leq t \leq N - 1$) について, 各画素 \mathbf{x} における蛍光色の色相を $h_t(\mathbf{x})$ とおく.
2. 次フレーム I_{t+1} における \mathbf{x} の周辺 $\xi_1 \times \xi_2$ 領域の蛍光色の平均色相を $\bar{h}_{t+1}(\mathbf{x})$ とおく (ξ_1, ξ_2 は定数). $\bar{h}_{t+1}(\mathbf{x}) - h_t(\mathbf{x})$ を色相差分の推定値として計算する.
3. 1, 2 を全てのフレーム番号 $1 \leq t \leq N - 1$ において, 状態が s と推定される全ての画素 \mathbf{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.

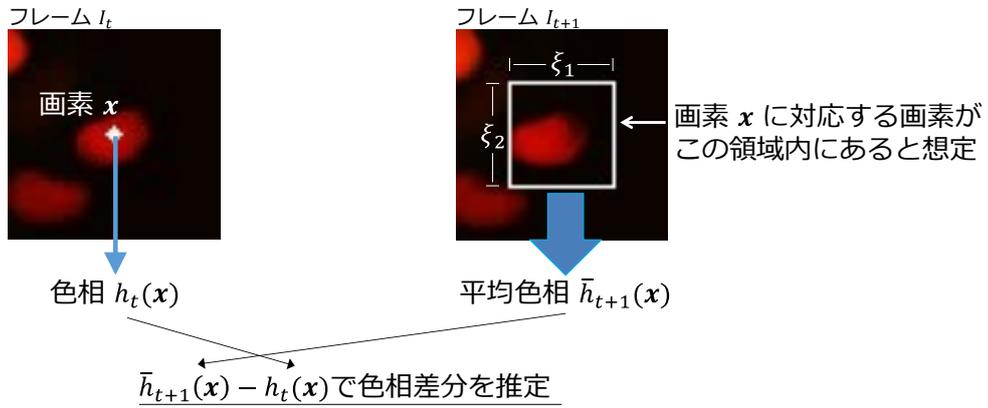


図 2.12 色相差分尤度の定義のための色相差分の推定

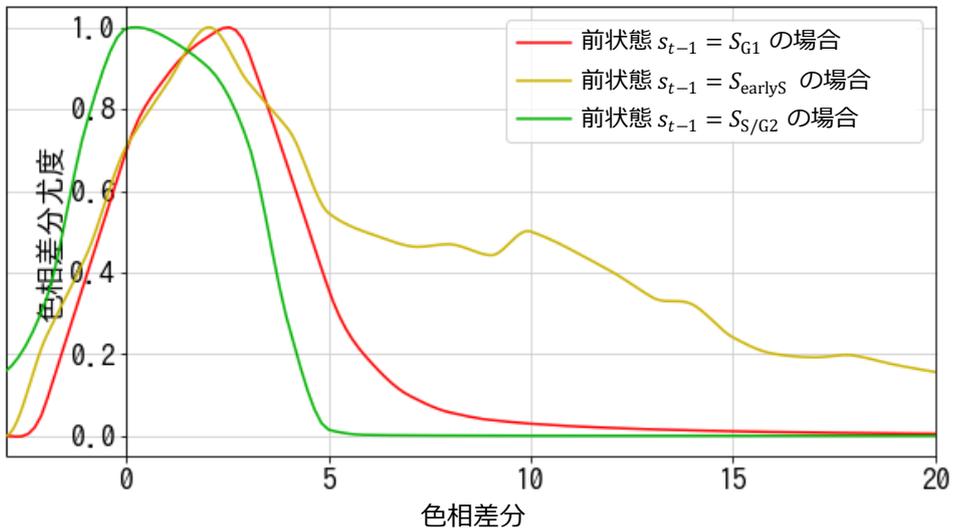


図 2.13 色相差分尤度の例

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。

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

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。

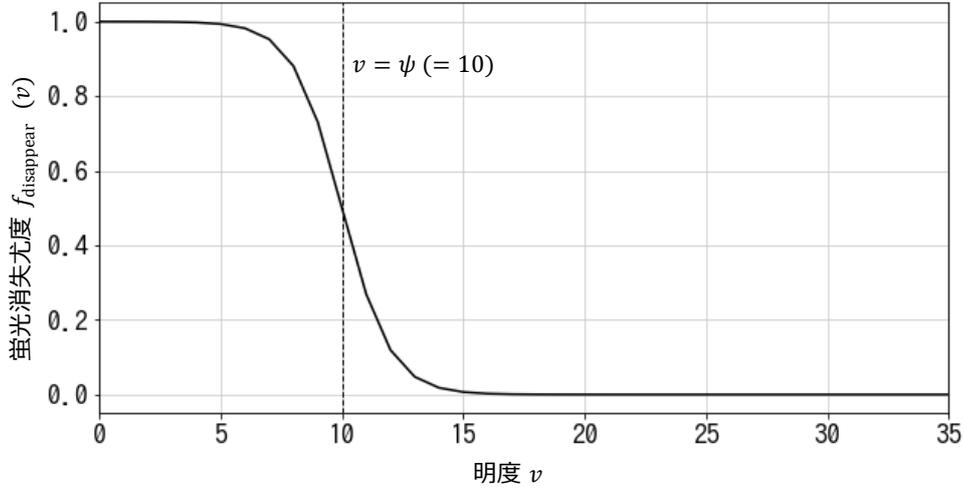


図 2.14 蛍光消失尤度 ($\psi = 10$)

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づ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 $\mathbf{x}_{t-1}^{(c')}$ ($c' \in C_t$, 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。
2. 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 $\mathbf{x}_{t-1}^{(c)}$ までの距離 d_{self} との比を

$$r_{\text{dist}} = \frac{d_{\text{border}}}{d_{\text{self}}} \quad (2.12)$$

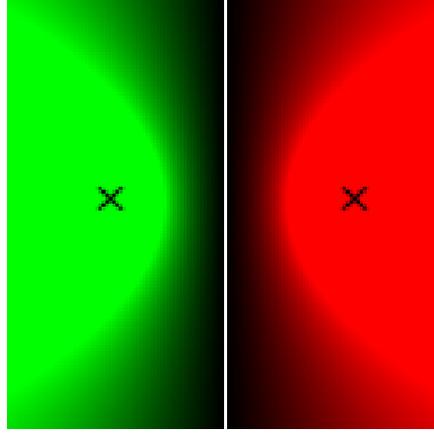


図 2.15 追跡器同士の追跡対象の取違えを防ぐための尤度調整因子 ($\beta = 1$, $\gamma = 0.001$, 画像のサイズは 128×128)

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

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

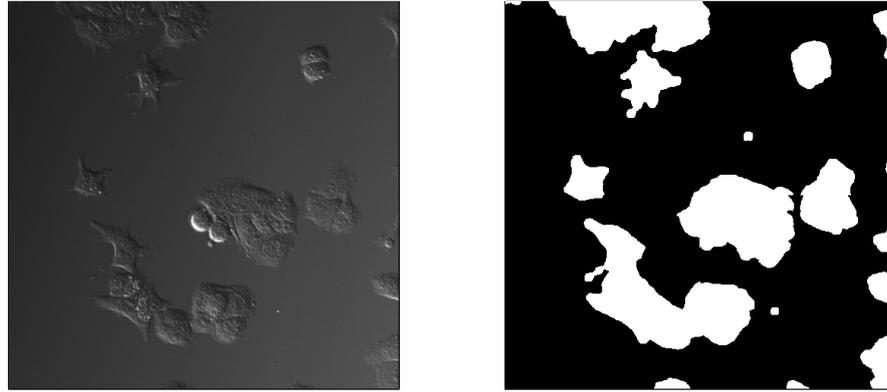
を計算し、当該パーティクルの尤度 (式 2.8) に乗算する。

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 \times 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 チャン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. 娘細胞が見つければ, 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 チャン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 \mathbf{x} にあるパーティクルの尤度 $f_{M/D}(\mathbf{x}, I)$ を次式で計算する.

$$f_{M/D}(\mathbf{x}, I) = \pi_{\text{fore}}(\mathbf{x}, I) \cdot \pi_{\text{fluor}}(\mathbf{x}, I), \quad (2.14)$$

ただし

$$\pi_{\text{fore}}(\mathbf{x}, I) = \begin{cases} 1 & (\text{位置 } \mathbf{x} \text{ はフレーム } I \text{ の細胞領域内}) \\ 0 & (\text{otherwise}) \end{cases}, \quad (2.15)$$

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

$0 < \omega \leq 0.5$ 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ンネルと緑色蛍光チャンネル、ならびに微分干渉顕微鏡で撮影された DIC チャンネルの3チャンネルで構成され、30分おきに150フレーム（約3日間）ずつ取得されている。蛍光チャンネルの解像度は赤色・緑色ともに $1,024 \times 1,024$ 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 (fluorouracil) 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

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对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 \mathcal{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 \mathcal{O} と \mathcal{H} の距離が閾値以下であるならば、より \mathcal{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 \mathcal{O} と \mathcal{H} をマッチさせる。
2. 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对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,

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

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,

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

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,

$$\text{MOTP} = \frac{\sum_{\mathcal{H}, t} d_{\mathcal{H}, t}}{\sum_t \text{TP}_t} \quad (2.19)$$

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,

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

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 導入細胞

表 2.1 動画画像 A の追跡結果の評価

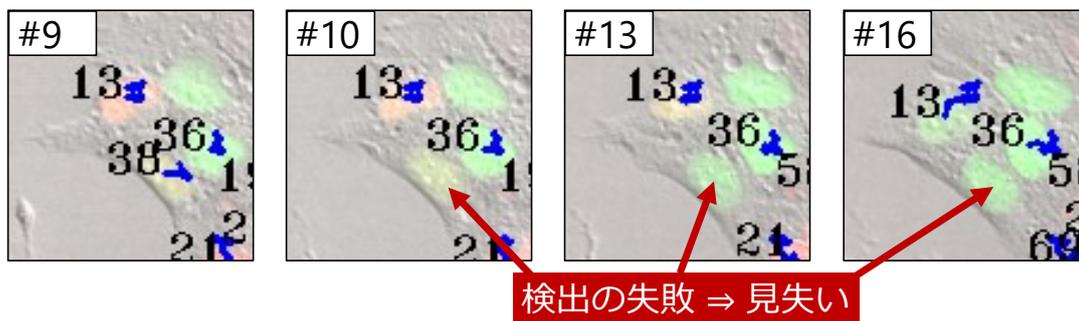
	TP ↑	FP ↓	FN ↓	Prec ↑	Rec ↑	MOTP ↓	IDSW ↓
提案手法	5,499	175	4,161	0.969	0.569	3.143	31
LineageTracker	4,771	0	4,889	1.000	0.494	1.248	121
	Frag ↓	MOTA ↑	MTC ↑	MTH ↑	MLC ↓	MLH ↓	
提案手法	26	0.548	0.515	0.383	0.124	0.336	
LineageTracker	121	0.481	0.189	0.086	0.167	0.545	

表 2.2 動画画像 B の追跡結果の評価

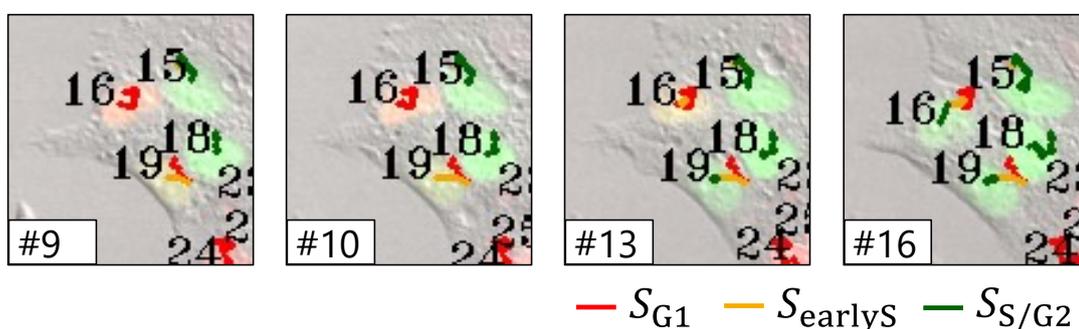
	TP ↑	FP ↓	FN ↓	Prec ↑	Rec ↑	MOTP ↓	IDSW ↓
提案手法	5,746	422	4,464	0.932	0.563	3.275	15
LineageTracker	5,721	2	4,489	1.000	0.560	1.093	116
	Frag ↓	MOTA ↑	MTC ↑	MTH ↑	MLC ↓	MLH ↓	
提案手法	16	0.520	0.614	0.470	0.145	0.340	
LineageTracker	119	0.549	0.279	0.124	0.198	0.601	

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

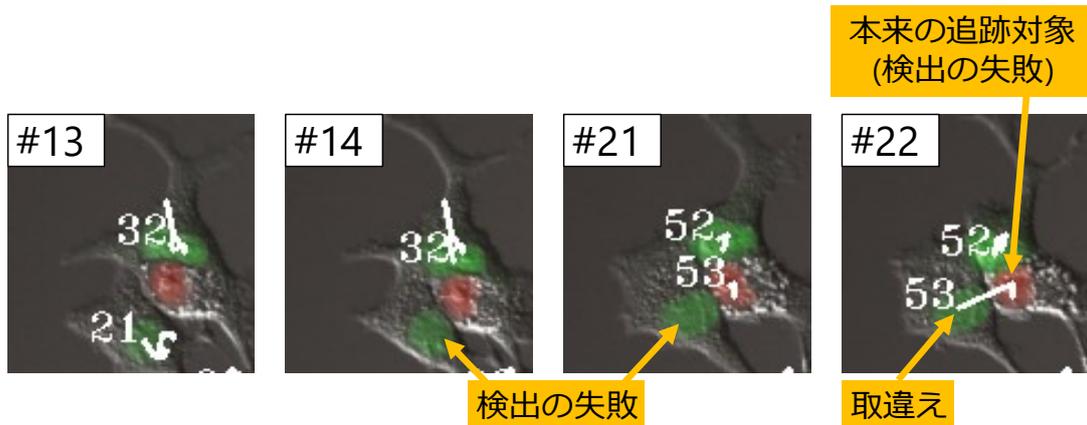
図 2.17 提案手法による追跡成功例 1 (動画 B の一部)

跡し続けることに成功している例である。

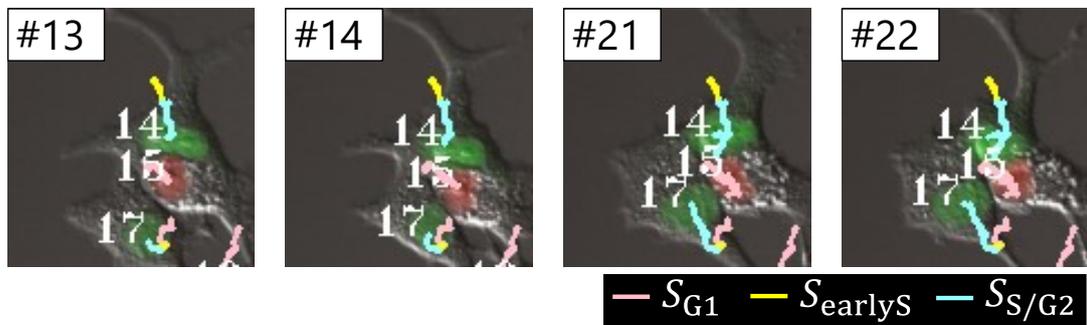
次に、提案手法が追跡に失敗している例を図 2.19 に示す。図 2.19 は、追跡器が追跡対象と未追跡細胞 (どの追跡器にも追跡されていない細胞) を取り違える例である。提案手法は主に色変化の自然さによって追跡対象を識別しているため、類似した色変化を示す未追跡細胞が近接すると対象の取違えを起こす場合がある。

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



(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 A の一部)

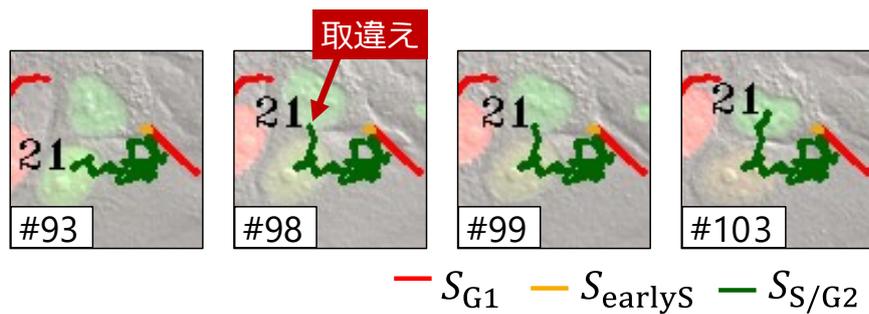


図 2.19 提案手法による追跡失敗例 (追跡中の細胞と近接する未追跡細胞との取違い)

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 S_{G1} の細胞の一部が異

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(取違い)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い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(取違い)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け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

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, 観察の打ち切り (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。打ち切りサンプルを含むデータを扱う場合, 打ち切りは状態遷移 (状態占有確率) に影響を与えないと仮定して, 打ち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ち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

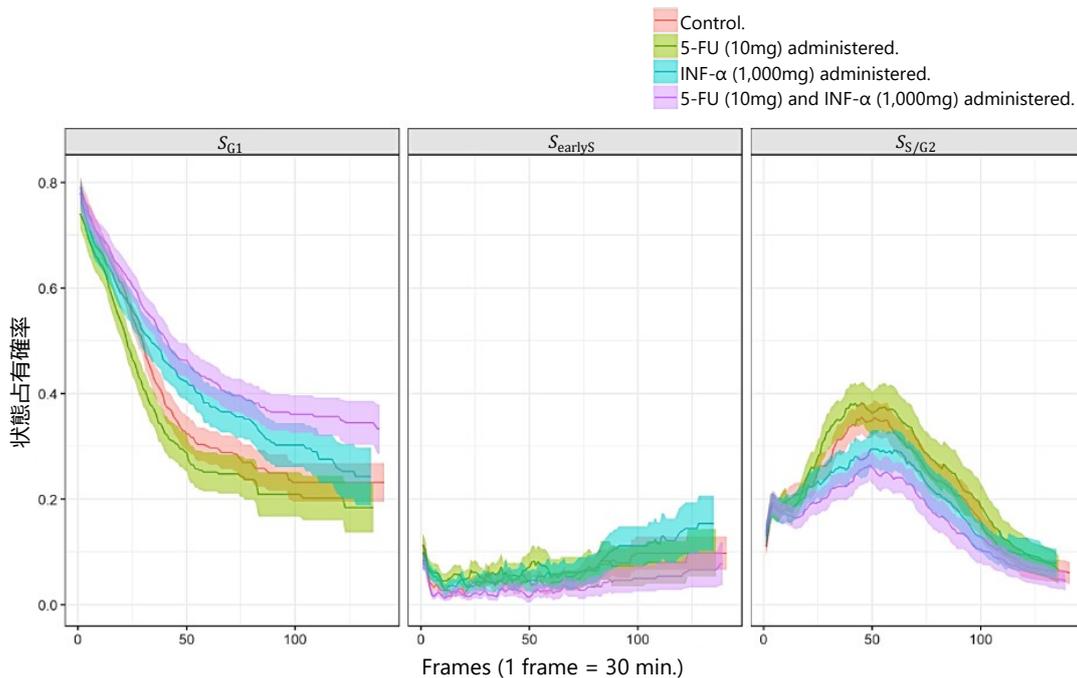


図 2.20 多状態イベントヒストリ解析による各状態の状態占有確率の推定

- 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のが、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を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旨とする. 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

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へ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]。

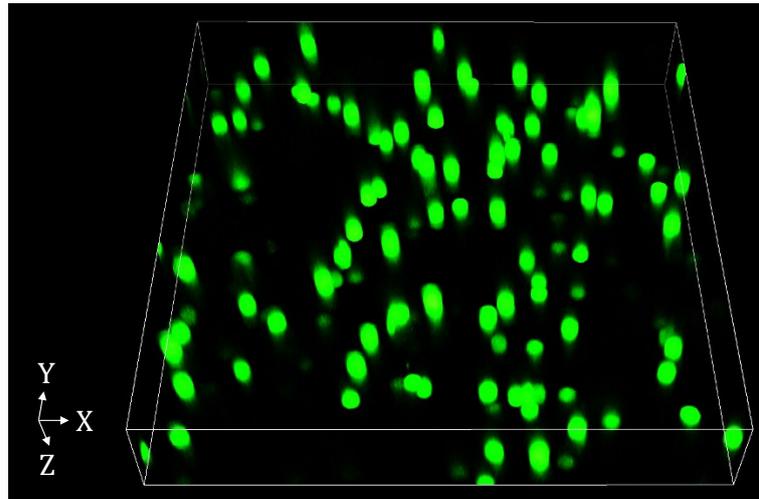
様々な生物学的プロセスにおける細胞遊走の性質や機序、制御機構を理解するためには、様々な条件下における細胞の遊走を観察し、それらの差異を明らかにすることが重要である。このような解析においては、個々の細胞がどのように移動したのかを可視化するイメージングが中心的な役割を果たしている。次節では、細胞遊走の可視化に適した、2光子励起顕微鏡による生体内イメージングについて説明する。

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

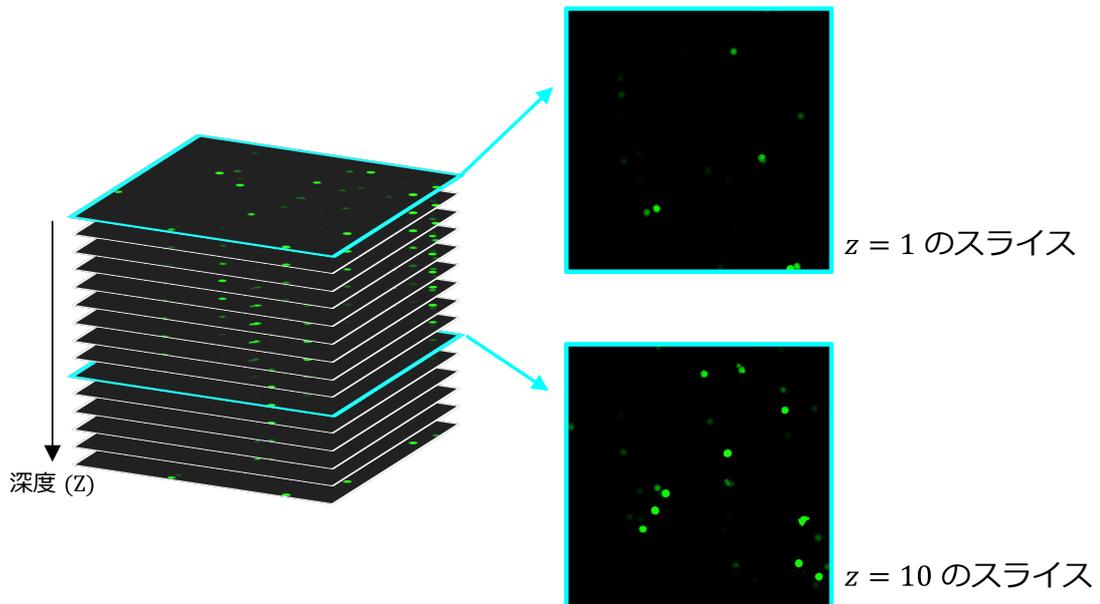
近年の蛍光観察技術の発展は、生きた細胞の運動を動画像 (タイムラプス画像系列) として可視化すること [16, 101] を可能にした。特に細胞遊走の理解においては、2光子励起顕微鏡 (two-photon excitation microscopy) [15, 16] が重要な技術のひとつとなっている。2光子励起顕微鏡は蛍光顕微鏡の一種であるが、励起に2光子吸収過程を利用する点が通常の蛍光顕微鏡とは異なっている。通常の蛍光顕微鏡が利用する1光子吸収過程では、1つの蛍光分子が励起光の光子の1つを吸収して励起状態に遷移する。一方2光子吸収過程では、蛍光分子が2つ (以上) の光子を同時に吸収する。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]。



(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な特徴は, 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.

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

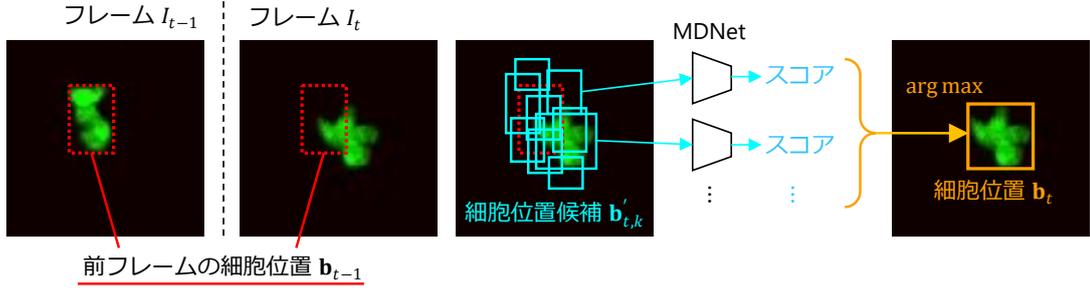


図 3.2 MDNet 法における追跡対象の検出

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 ($1 \leq t \leq N$) 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 ($t \geq 2$) 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 $\mathbf{b}'_{t,k} = (x'_{t,k}, y'_{t,k}, w'_{t,k}, h'_{t,k})$ ($1 \leq k \leq K$) を以下の分布に従って生成する。

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

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

$$w'_{t,k} = w_{t-1} \cdot a_2^q, \quad (3.3)$$

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

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 \mathbf{b} で囲まれた領域を切り出す操作を $I(\mathbf{b})$ ，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 $\mathbf{b}'_{t,k}$ について $m(I_t(\mathbf{b}'_{t,k}))$ 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，

$$k_{\text{best}} = \arg \max_{1 \leq k \leq K} m(I_t(\mathbf{b}'_{t,k})) \quad (3.5)$$

とにおいて，

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

とする．以上の手続きを $t = 2, \dots, N$ 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．

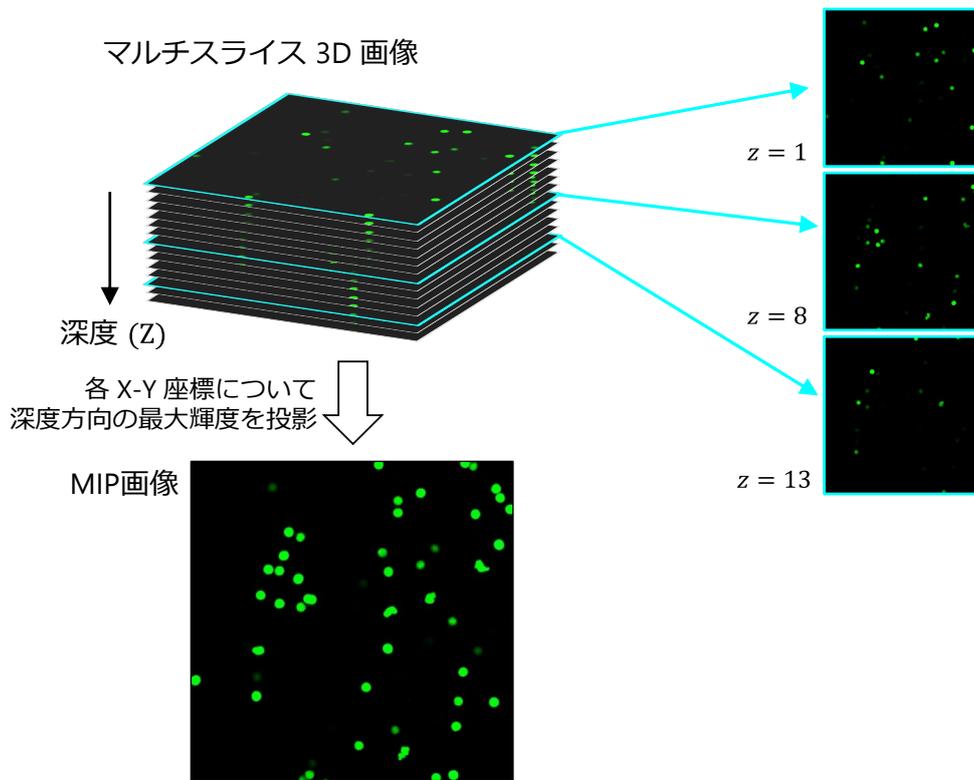


図 3.3 最大値投影法 (MIP) によるマルチスライス 3D 画像から 2D 画像への変換

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

$$i_{\text{MIP}}(x, y) = \max_z i(x, y, z) \quad (3.7)$$

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

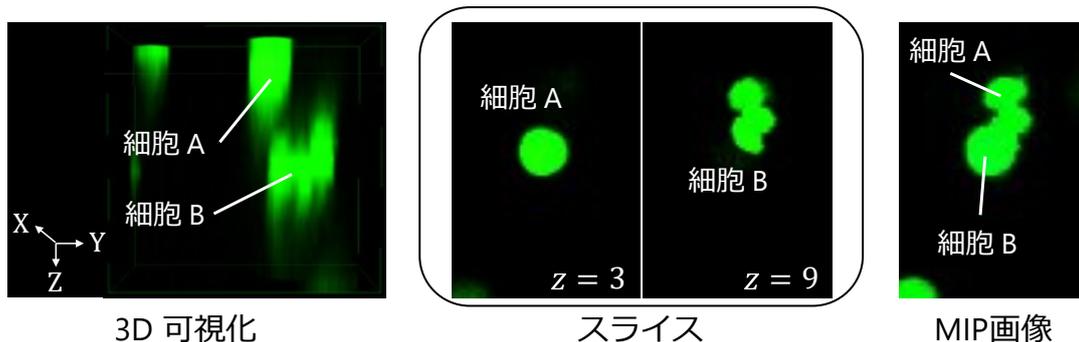


図 3.4 MIP 画像における深度方向に重畳する細胞

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。チャンネル数は任意であるが、蛍光画像以外のチャン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 $\mathbf{b}_t^{(c)} = (x_t^{(c)}, y_t^{(c)}, w_t^{(c)}, h_t^{(c)})$ 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 ($1 \leq t \leq N$) 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, \dots, 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 $\mathbf{b}_1^{(c)} = (x_1^{(c)}, y_1^{(c)}, w_1^{(c)}, h_1^{(c)})$ 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。

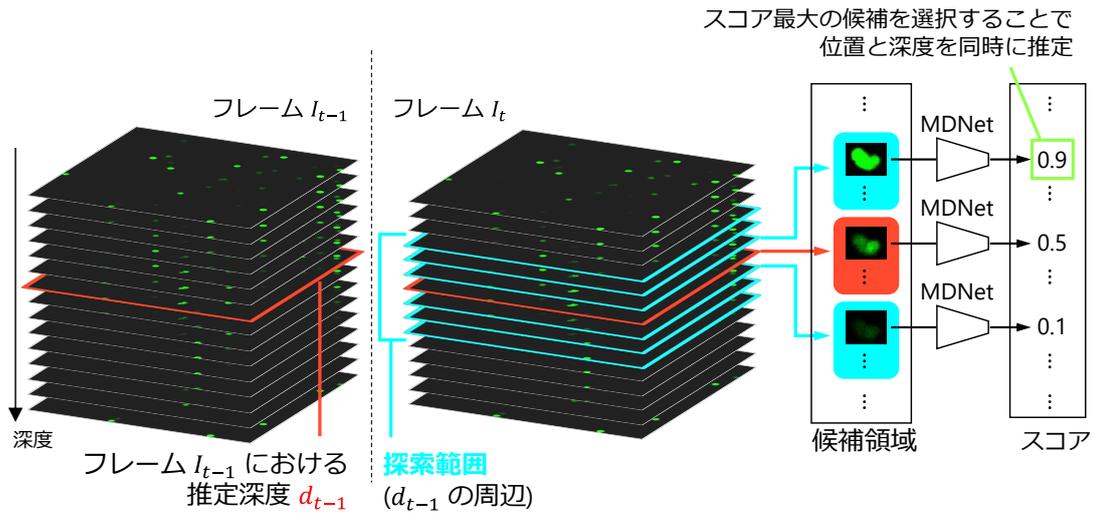


図 3.5 提案手法による細胞位置と深度の推定

最大となるスライスの深度を $d_1^{(c)}$ とする.

$$d_1^{(c)} = \arg \max_{1 \leq d \leq D} m \left(I_1 \left(\mathbf{b}_1^{(c)}, d \right) \right), \quad (3.8)$$

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 \mathbf{b} の囲む領域を切り出す操作を $I(\mathbf{b}, d)$ 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 ($2 \leq t \leq N$) 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 $G \left(d_{t-1}^{(c)}, (a_1 r)^2 \right)$ 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 $\pm 2a_1 r$ 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

$$\mathcal{B}_t = \{\mathbf{b}'_{t,k} \mid 1 \leq k \leq K\} = \{(x'_{t,k}, y'_{t,k}, w'_{t,k}, h'_{t,k}) \mid 1 \leq k \leq K\} \quad (3.9)$$

とおく。

2. 現フレーム I_t における深度の候補の集合 \mathcal{D} を以下で定める。

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

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。

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

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) 25 μ g/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 \times 512、1 画素のサイズは一辺が 0.5 μ m である。深度方向は 3.0 μ m 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.

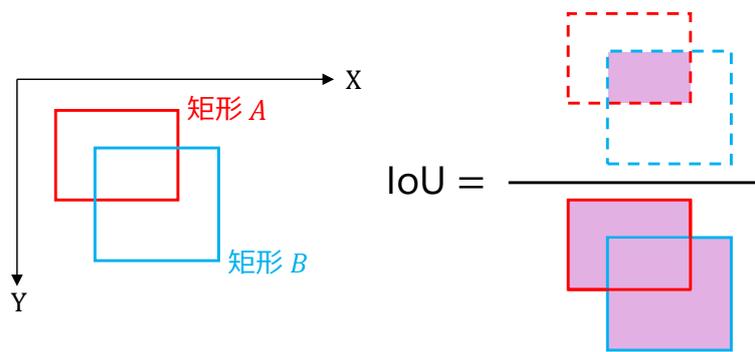
MDNet のネットワーク構造を含むハイパパラメータはオリジナルの MDNet 法での設定 [122] に準拠した. 特に式 3.1–3.4 においては $a_1 = 0.3$, $a_2 = 0.25$, $a_3 = 0$, $a_4 = 0.25$ と定めた.

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.

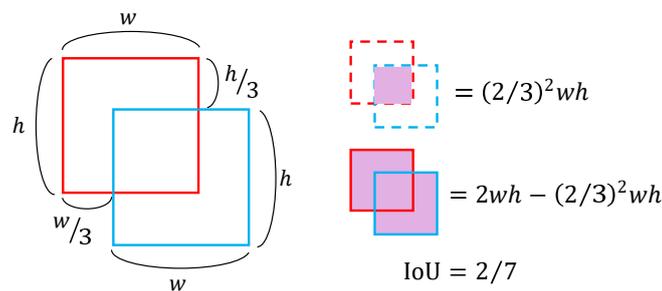
3.6.1.5 評価指標 2.6 節の実験と同様に CLEAR 指標と MTC (mostly-tracked cells), MTH (mostly-tracking hypotheses), MLC (mostly-lost cells), MLH (mostly-lost hypotheses) を用いた. それぞれの定義は 2.6.1.4 節に示されている. ただし本研究では, 細胞の位置を重心座標 (単一点) ではなく外接矩形で表現しているため, 2.6.1.4 節の各指標の定義における「距離」は, 「矩形同士の重なり小ささ」を用いた. 矩形同士の重なり度合いは, 両矩形の共通部分の面積を, 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 と B の IoU は

$$\text{IoU} = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \quad (3.12)$$

と定義される. なお, IoU は矩形同士が同一に近づくほど大きくなる (1 に近づく) ため, 点同士が近づ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 $1 - \text{IoU}$ を「距離」として用いた. また, 各指標の計算に用いる距離 ($1 - \text{IoU}$) 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



(a) 定義



(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

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

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↑は値が大きいくほど良い指標、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。

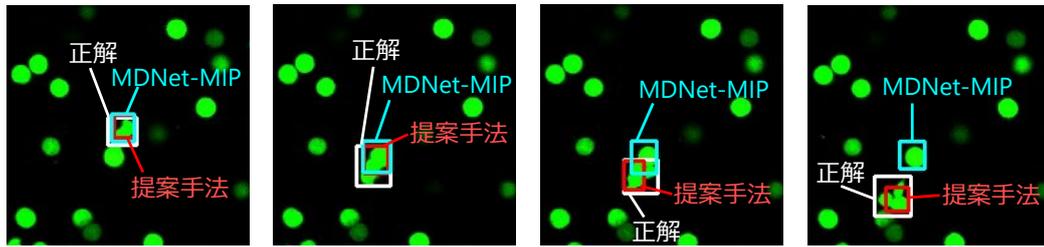
3.6.2.2 追跡結果例 提案手法と従来の MDNet 法 (MDNet-MIP) の追跡結果が異なっている例を図 3.7 に示す。図 3.7 の上段では、MIP 画像上に正しい細胞位置の矩形、

表 3.1 追跡結果の定量的評価 (平均値 \pm 標準偏差)

	TP \uparrow	FP \downarrow	FN \downarrow	
提案手法	1,722.1 \pm 2,303.6	111.1 \pm 88.1	111.1 \pm 88.1	
MDNet-MIP	1,706.0 \pm 2,317.5	127.2 \pm 117.6	127.2 \pm 117.6	
LineageTracker	1,137.9 \pm 1,476.1	110.8 \pm 90.9	695.2 \pm 893.8	
	Prec \uparrow	Rec \uparrow	MOTP \uparrow	
提案手法	0.914 \pm 0.054	0.914 \pm 0.054	0.686 \pm 0.047	
MDNet-MIP	0.897 \pm 0.076	0.897 \pm 0.076	0.707 \pm 0.045	
LineageTracker	0.865 \pm 0.108	0.641 \pm 0.122	0.524 \pm 0.050	
	IDSW \downarrow	Frag \downarrow	MOTA \uparrow	
提案手法	3.154 \pm 4.588	12.7 \pm 10.9	0.826 \pm 0.111	
MDNet-MIP	5.077 \pm 8.695	12.7 \pm 10.6	0.792 \pm 0.154	
LineageTracker	3.538 \pm 4.069	34.5 \pm 29.5	0.537 \pm 0.179	
	MTC \uparrow	MTH \uparrow	MLC \downarrow	MLH \downarrow
提案手法	0.892 \pm 0.073	0.890 \pm 0.076	0.012 \pm 0.017	0.013 \pm 0.020
MDNet-MIP	0.864 \pm 0.088	0.864 \pm 0.088	0.017 \pm 0.025	0.018 \pm 0.025
LineageTracker	0.463 \pm 0.159	0.663 \pm 0.223	0.187 \pm 0.102	0.045 \pm 0.065

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．

MIP 画像



3D 可視化

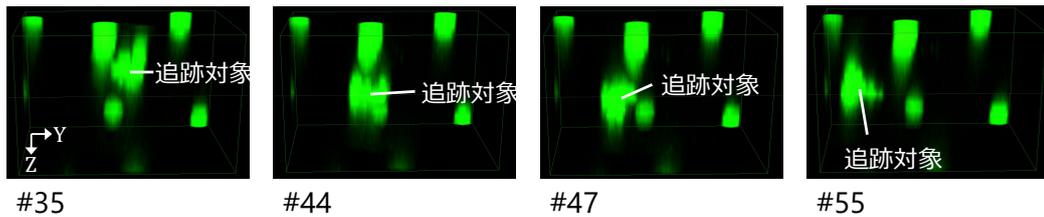


図 3.7 提案手法と従来の MDNet 法の追跡結果の例 (上段: MIP 画像と追跡結果, 下段: 3D 可視化)

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

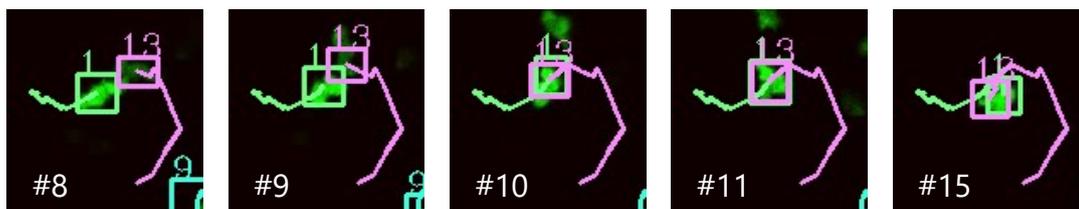


図 3.8 追跡器の「衝突」(複数の追跡器が同じ細胞を追跡する)の例

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 suppression) [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。

表 3.2 解析に用いた動画像のフレーム数

(a) LPS 刺激		(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		

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っているかを定量化するための基本的な特微量となる。

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 10 μ g/ml, 82 本は GM-CSF 25ng/ml, 3 本は PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 1 μ g/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 \times 512, 1 画素のサイズは GM-CSF 刺激の動画像 1 本のみ 0.25 μ m, その他の動画像では 0.5 μ m となっている。深度方向は 3.0 μ m 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 (1 μ s 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。

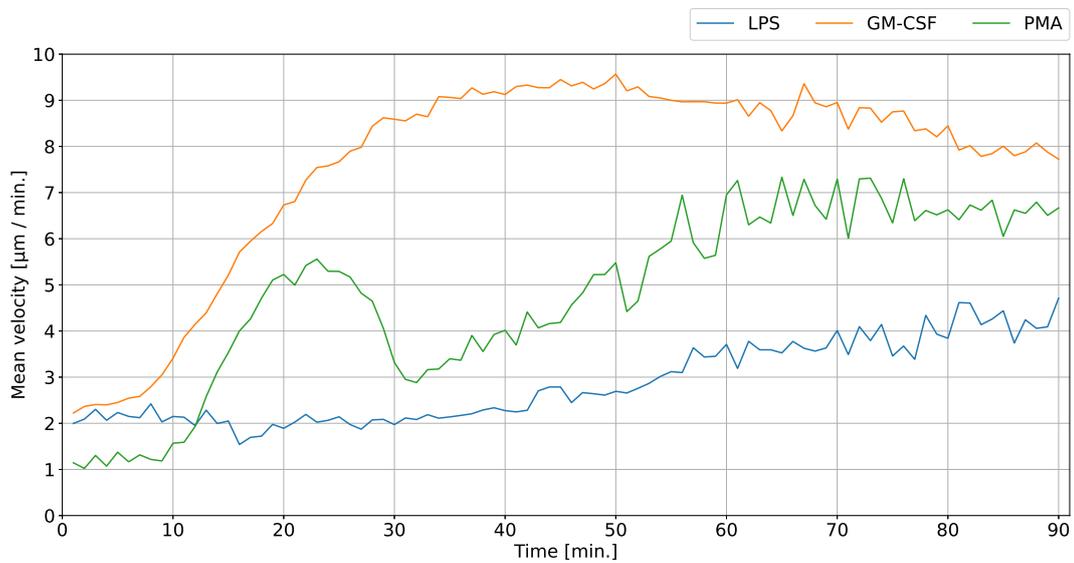


図 3.9 提案手法で抽出した好中球の平均速度の経時変化

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な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

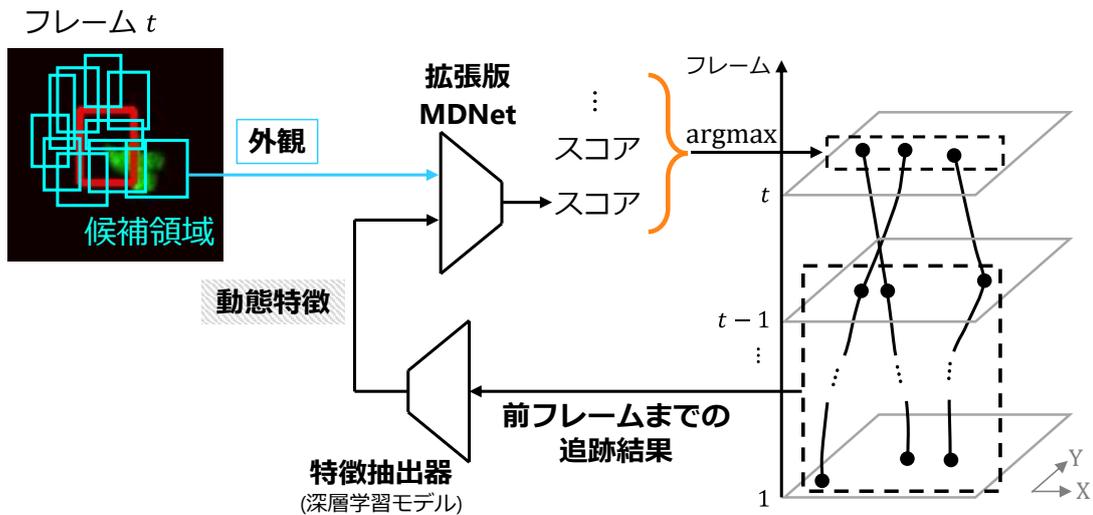


図 4.1 動態特徴をフィードバックした深層学習による細胞追跡手法の構想

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) 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ツスクリーニング (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，内田穰 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

- [1] 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.
- [3] 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 anti-inflammatory 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. *Bioinformatics*, 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 multi-frame 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 IFNAR2-expressing 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 occlusion-aware 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. Guillaumot, 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, 内田穰, 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 Immunopathology*, 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. Shakhbar. 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 ischemia-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. *Neurocomputing*, 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: Instance-aware 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] Ö. 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- κ b, 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. Granulocyte-macrophage 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-1 α -NF- κ B 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.