

遺伝的プログラミングを用いた 角膜内皮細胞の特徴量自動抽出システムの提案

Automatic extraction systems of feature values of corneal endothelial cells
using Genetic Programming

布川 将来人*¹
Sakito NUNOKAWA

山口 浩明*²
Hiroaki YAMAGUCHI

小泉 範子*³
Noriko KOIZUMI

奥村 直毅*³
Naoki OKUMURA

横内 久猛*³
Hisatake YOKOUCHI

廣安 知之*³
Tomoyuki HIROYASU

*¹同志社大学大学院生命医科学研究科
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University

*²同志社大学大学院工学研究科
Graduate School of engineering, Doshisha University

*³同志社大学生命医科学部
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

In cornea tissue engineering, a researcher measures cell density and a form, in order to check the status of a cultivated cell. In our research, genetic programming (GP) is used to construct image filters which can detect cell regions from corneal endothelial cells images. In this paper, the fitness function of GP was discussed. In this problem, there are two factors which should be evaluated; those are degree of image coincidence and number of cells. The discussions were performed through the numerical experiments.

1. はじめに

近年、高齢化に伴い角膜障害が増加してきているが、この角膜障害の治療法としてはドナーから得た角膜移植以外に有効な治療は行われていない。しかし、この角膜移植においてもドナー不足などの問題が挙げられる。そこで角膜障害に対する新たな治療法として角膜再生医療が注目されている [Koizumi 08]。

角膜再生医療では、人から得た角膜内皮細胞を培養し、培養した細胞を移植する事で治療を行っている。角膜内皮細胞を培養するうえで、細胞密度や個々の細胞の形状が六角形に近いかなどがその細胞が正常に培養できているかの指標となる。そのため、細胞画像から細胞数、形状といった特徴量を計測する事が重要になってくる。現状、細胞解析の為に様々なソフトウェアが開発されている [Carpenter 06],[Michal]。しかし、それらを利用する際に、使用者本人が対象とする画像毎に適した画像処理の手法を選択する必要があるなど画像処理の知識が必要になってくるのが研究者の大きな負担となっている。

そこで本研究グループでは、細胞画像から細胞数、形状といった特徴量を、画像処理の知識を必要とせずに自動で計測可能なシステムの構築を目的としている [Hiroyasu 11], [布川 11]。本システムでは細胞画像から細胞領域を抽出し、抽出した細胞領域画像から特徴量の計測を行う。また、細胞画像から細胞領域を抽出する際に、対象に特化したひとつの画像処理フィルタを構築するのではなく、複数の既存フィルタを組み合わせることで目的の処理である細胞領域の抽出を行う。そして、フィルタの組み合わせを自動で構築するために、木構造の組み合わせ最適化をおこなう自動プログラミング手法である遺伝的プログラミング (Genetic Programming: GP) [Koza 92] を用いる [Nagao 97]。

しかし、本システムで用いている GP では、高い評価値を

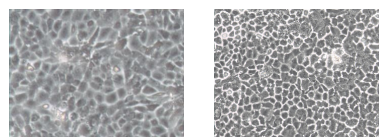


図 1: 培養角膜内皮細胞画像

得ても細胞を正確に分割できないといった問題があげられる。これは本システムで用いている評価関数が、GP を画像処理に適用する際に一般的に用いられているものであり、細胞の分割状態を評価に反映していないためである。

そこで、細胞領域分割において重要なパラメータである細胞数を評価関数に組み込むことで、より正確な細胞領域抽出を行うことができるかの検討を行う。すなわち、細胞数の値を評価関数に含ませた場合及び、細胞数を制約条件として取り扱った場合について検討する。

本稿では、角膜内皮細胞画像の特徴量を自動抽出する手法とそれを実現するシステムの提案、細胞領域抽出の為の評価関数の提案と実験。特徴量抽出の実験結果について述べる。

2. 角膜内皮細胞画像の特徴量自動抽出手法

培養された角膜内皮細胞において、細胞の数や形状、密度といった特徴量が細胞の状態を確認するうえで重要になってくる。しかし、顕微鏡によって撮影した角膜内皮細胞画像は図 1 に示すような画像であるため、撮影した画像から直接特徴量を計測することは困難である。

そこで、下記に示す 2 段階の処理を行うことによって、角膜内皮細胞画像から特徴量の抽出を行う。

step.1 細胞画像から細胞領域を抽出

step.2 細胞領域から特徴量 (数, 大きさ, 形状) を計測

連絡先: 布川 将来人, 同志社大学大学院生命医科学研究科, 京都府 京田辺市多々羅都谷 1-3, 0774-65-6130, snunokawa@mis.doshisha.ac.jp

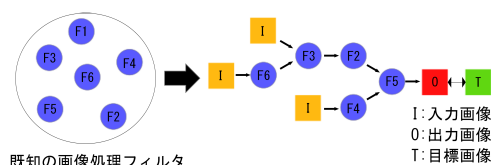


図 2: 木構造状フィルタ

本稿ではこの 2 段階の処理を行うことで、角膜内皮細胞画像から特徴量を抽出する事が可能なシステムの提案及び検討を行う。

3. 提案システム

本章では、前章で述べた手法をシステムとして実現する為に GP を用いた画像処理手法及び特徴量の自動抽出方法について述べる。

3.1 細胞画像からの細胞領域抽出

一般的に複雑な画像変換も既知の単純な画像処理フィルタを組み合わせて表現することができると考えられる。そこで本システムでは、細胞領域抽出の為に画像処理を行う際、対象に特化した一つの画像処理フィルタを構築するのではなく、既存の簡単な処理を行うフィルタを多数用意し、それらを複数組み合わせさせた木構造状フィルタによって目的の画像処理を行う。この木構造状フィルタを作成する際に、木構造状の組み合わせを自動で最適化できる手法である GP を用いる。本節では、細胞領域抽出のための木構造状フィルタを GP を用いて構築する手法及び GP について述べる。

3.1.1 木構造状フィルタの構築

本研究では、画像処理を既知の画像処理フィルタの組み合わせ最適化問題として捉え、最適化問題の解を求めることで、目的の画像処理を行う事が可能な画像処理フィルタを構築する。この手法では、原画像と処理目的に応じて適切に処理を行った目標画像を学習画像セットとして使用する。入力画像として原画像を与えたときに出力画像が目標画像と同様になるように、フィルタの並びを最適化することで図 2 のような木構造状フィルタを作成する。作成した木構造状フィルタの終端ノードに原画像を入力し、各ノードに対応した既知のフィルタの処理を順に行っていくことで出力画像が作成される。

また最適な組み合わせの探索を、自動プログラミング手法である GP を用いて行う為、使用者は画像処理の知識に左右される事なく必要な画像処理フィルタを自動で構築する事が可能である。作成した木構造状フィルタの評価指標として式 (1) の評価関数を用いる。この評価関数では、出力画像 $O(x, y)$ と目標画像 $T(x, y)$ の各ピクセル値の差分によって評価値を決定する。最大値を 1.0 とし、 W_x は画像の横サイズ、 W_y は画像の縦サイズ、 V_{max} は最大階調値 (255) を示す。

$$F_{original} = \frac{\sum_{x=1}^{W_x} \sum_{y=1}^{W_y} |O(x, y) - T(x, y)|}{W_x * W_y * V_{max}} \quad (1)$$

3.1.2 Genetic Programming

Genetic Programming (GP) は、最適化手法である遺伝的アルゴリズム (Genetic Algorithm: GA) [Goldberg 89] を木構造や、グラフ構造などの構造的な表現で扱えるように拡張した自動プログラミング手法である。GP では、選択、交叉、突然変異といった遺伝的オペレータを繰り返し行う事で、問題に適した解を生成する。GP の処理手順を以下に示す。

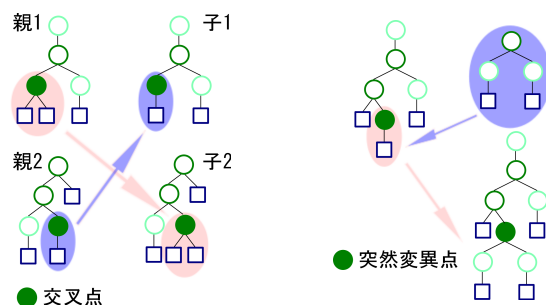


図 3: 交叉

図 4: 突然変異

Step.1 初期化 (Initialization)

初期個体群 (母集団) として、ランダムに集団数だけの個体 (木構造) を生成する。

Step.2 評価 (Evaluation)

各個体の適合度を計算する。

Step.3 選択 (Selection)

集団の中から評価値を基準として、次世代に残す個体を集団数だけ選択する。

Step.4 交叉 (Crossover)

集団の中からランダムに選択した 2 個体を対象とし、それぞれランダムに交叉点を選び、Fig.3 のように交叉点以下の部分木を交換する。

Step.5 突然変異 (Mutation)

対象となる個体から、ランダムに突然変異点を選択し、突然変異点以降の木を、ランダムに作成した突然変異木と入れ替える。突然変異の様子を Fig.4 に示す。

Step.6 終了条件 (Terminal Criterion)

予め決めておいた終了条件に到達するまで Step 2 ~ Step 5 を繰り返す。主な終了条件として探索世代数や、目的の個体に達したか否かなどが挙げられる。

3.2 細胞領域からの特徴量抽出

本研究では、細胞領域画像から細胞数、細胞の大きさを抽出する為に、ラベリング処理を用いる [Sonka 94]。ラベル数を細胞の数、同じラベルを持つ画素の数を細胞サイズとして計測する。

また、細胞の形状を計測するにあたって、角膜内皮細胞では六角形の細胞がより正常な細胞と判断される。その為、それぞれの細胞が六角形であるかを判断する [Koizumi 08]。形状の判断基準として、細胞が 3 つ以上隣接している画素を頂点と考え、6 つの頂点と隣接している領域を六角形とする [Tinena 09]。

4. 細胞数を考慮した評価関数の検討

4.1 概要

3.1.1 項で述べたように GP を用いて木構造状フィルタを構築する事で、角膜内皮細胞画像から細胞領域の抽出を行う。しかし、本研究グループにおいて、フィルタを構築する際に用いている式 (1) の評価関数は GP を画像処理に適用する際に用いる一般的な評価関数であり、評価関数が高くて細胞がうまく分割できていないという問題がある。そこで、本章では細

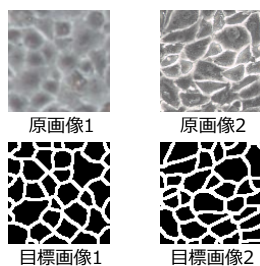


図 5: 学習画像セット

胞の分割に適した評価関数の検討を行う。細胞の分割を行う際に重要な特徴として細胞数があげられる。そこで、3.1.1 項で示した式 (1) に原画像と目標画像の細胞数の誤差を加えた評価関数を用いる。細胞数の誤差率を加えた評価関数を式 (2) に示す。式 (2) において $F_{original}$ は式 (1) であり、 C_o は出力画像の細胞数、 C_t は目標画像の細胞数、 $weight$ は重み (0.0 ~ 1.0) を示す。

$$F_{proposal} = 1 - \left\{ \frac{F_{original} + \left(\frac{C_o}{C_t} * weight \right)}{1 + weight} \right\} \quad (2)$$

また、細胞数の誤差を評価関数として用いるのではなく、制約条件として GP に反映させた場合についての検討も行う。制約条件に細胞数の誤差を反映させる方法はいくつか考えられるが、本稿では GP における選択の際に細胞数の誤差が一定以上の個体を選択の候補から外すといった手法を用いる。

4.2 評価実験

4.2.1 実験概要

本章では、4.1 節で述べた評価関数及び制約条件を用いた GP を細胞領域抽出に適用し、評価関数に細胞数をどのように組み込むべきかの調査をおこなう。本実験の対象画像として、図 1 で示したような 6 枚の培養角膜炎内皮細胞画像を用いる。図 1 は、共著者である小泉、奥村によって作成された画像であり、カニクイザルから採取した角膜内皮細胞を培養し顕微鏡によって撮影した画像である。また、図 5 に示すような学習画像セットを用いて細胞領域の抽出を行うフィルタの構築を行う。図 5 における原画像は、図 1 のような検体の異なる 6 枚の対象画像からそれぞれ 100×100 で切り出した画像であり、目標画像は原画像における細胞壁を白、細胞領域を黒にマーキングした画像である。使用した既知のフィルタを表 1, 2 に、GP のパラメータを表 3 に示す。

比較する評価関数は、一様性のみで式 (1) に加え、4.1 節で述べた細胞数の誤差を加えた式 (2) の重み ($weight$) を 1.0, 0.5, 0.25 に設定したもの、制約条件として目標画像と出力画像の細胞数の誤差率が一定以下のものを選択に加ええないもの計 5 パターンである。また、制約条件とする細胞数の誤差率 (0.0 ~ 1.0) の除外条件は世代が進むごとに厳しくなるように設定した。1 試行につき 2000 世代で行った為、初期値を 0 とし 200 世代ごとに 0.1 ずつ除外する誤差率を上昇するように設定した。

6 枚の画像に対して 5 パターンの評価方法及び制約でフィルタの構築を行い、構築したフィルタによって得られた出力画像の一致度及び細胞数の誤差率の 5 試行平均での比較・評価を行う。また、それぞれの試行において構築したフィルタによって得られた出力画像の細胞誤差率が 0.1 以内のものを制約をクリアしたフィルタと考え、制約をクリアした試行数の比較を

表 1: 1 入力フィルタ

number	フィルタ名
f1	最小値
f2	最大値
f3	収縮
f4	膨張
f5	平均値
f6	中央値
f7	ガウシアン
f8	二値化 (平均)
f9	二値化 (大津)
f10	一次微分
f11	二次微分①
f12	二次微分②
f13	反転
f14	孤立領域 (小)
f15	孤立領域 (大)
f16	高域通過
f17	低域通過
f18	領域分割

表 2: 2 入力フィルタ

number	フィルタ名
F1	論理和
F2	論理積
F3	代数和
F4	代数積
F5	限界和
F6	限界積

表 3: GP のパラメータ

パラメータ	値
世代数	2000
個体数	300
選択手法	トーナメント
トーナメントサイズ	2
交叉率	0.9
突然変異率	0.1
ペナルティ	0.0008
深さ制限	20
試行回数	5

行う。

また、構築したフィルタの汎用性の違いについて検討するために、対象画像から原画像とは別の部分を切り出したテスト画像 2 枚に対して適用した結果得られた一致度、細胞数の誤差率、制約をクリアした試行数の比較・評価を行う。

4.2.2 実験結果

それぞれの評価方法によって構築したフィルタで得られた出力画像の一致度及び細胞数誤差率の平均を表 4 に、構築したフィルタをテスト画像に適用した結果を表 5 に示す。また、表 4, 5 に示す平均値は 6 枚の原画像からそれぞれ 5 試行ずつ行った計 30 回のデータの平均値である。

表 4, 5 において previous は評価関数が一致度のみのもを、proposal(1.0), proposal(0.5), proposal(0.25) は式 (2) の $weight$ を 1.0, 0.5, 0.25 に設定したものを、constraint は制約条件を加えたものを示す。

表 4 の結果から、原画像に対する一致度においては previous, proposal(0.25), constraint が、細胞数誤差率においては proposal(0.5) が、制約クリア数においては proposal(0.5), proposal(0.25), constraint が良好な結果を示した。

また、表 5 の結果から、テスト画像に対する一致度及び制約クリア数においては、proposal(0.25) が、細胞数誤差率においては proposal(0.5) が 5 パターンの中で最良の結果を示した。

これらの結果から、原画像の一致度という点においては、評価関数を一致度のみにした方が良好な結果を得られる。しか

表 4: 出力画像の一致度及び細胞誤差率平均 (5 試行平均)

手法	一致度	細胞数誤差率	制約クリア率
previous	0.948	0.108	0.767
proposal(1.0)	0.919	0.040	0.967
proposal(0.5)	0.933	0.011	1.000
proposal(0.25)	0.947	0.015	1.000
constraint	0.946	0.067	1.000

表 5: テスト画像への適用結果 (5 試行平均)

手法	一致度	細胞数誤差率	制約クリア率
previous	0.901	0.196	0.317
proposal(1.0)	0.883	0.207	0.433
proposal(0.5)	0.900	0.139	0.417
proposal(0.25)	0.910	0.147	0.517
constraint	0.895	0.152	0.433

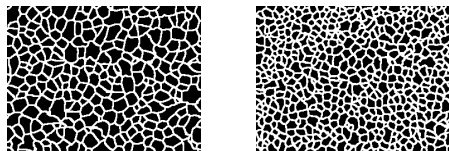


図 6: フィルタによって抽出した細胞領域画像

し、細胞数の誤差やテスト画像に対する汎用性を考えると、細胞領域抽出を行う際の評価関数に細胞数を加えることで、より正確に細胞領域を分割する事が可能なのではないかと考えられる。そして、細胞数を付加する場合には細胞数の誤差に付加する重みが重要であり、今回の結果から 0.25 ~ 0.5 付近に重みを取る事で良好な細胞分割を行えるのではないかと考えられる。また、細胞数の誤差を制約条件として加えることで目標画像との一致度は僅かに低下するものの、細胞数という点では良好な結果を得られた。

今後、今回使用した制約条件とは異なった形での制約条件の不可や、制約条件下でかつ評価関数を変更した場合などの検討を行っていく必要があると考えられる。また、今回は適応した対象画像全ての平均値によって比較を行ったが、対象画像の違いによって結果が異なってくるのかどうかについての検討も行う必要がある。

5. 特徴量の抽出実験

5.1 実験概要

本実験では、提案システムを用いて角膜内皮細胞画像の細胞領域画像から特徴量を抽出する事ができるかの検討を行う。

提案システムによって得られた細胞領域画像から 3.2 節で述べた手法によって特徴量の自動抽出を行う。図 1 のような 6 枚の対象画像の内、テスト画像においても 0.9 以上の一致度を得ることができた 4 枚の細胞画像を対象とした。4 枚の対象画像に対して、それぞれの学習画像から構築したフィルタを適用し得られた細胞領域画像から、特徴量として細胞数、六角形細胞数、細胞サイズなどの抽出を行う。特徴量抽出に使用した細胞領域画像の一例を図 6 に示す。

5.2 実験結果

提案手法によって細胞領域画像から得られた特徴量を表 6 に示す。表 6 において num は細胞数、6E は六角形細胞数、AVE は細胞サイズの平均値 (μm)、SD は細胞サイズの標準偏差 (μm)、ECD は細胞密度 (num/mm^2) を示す。また、num は細胞の全体が画像内に存在する細胞の数である。これは形状や大きさを測る際に、細胞の全体像が必要な為である。

提案手法によって、角膜内皮細胞画像の細胞領域画像から細胞の状態判断の際に有用な特徴量を自動で抽出する事ができた。今後、これらの特徴量が正確に抽出できているかどうかを検討する必要がある。また、クラスタリングなどを用いることで、これらの特徴量から細胞がうまく培養出来ているか否かな

表 6: 細胞領域画像からの特徴量抽出結果

パラメータ	img1	img2	img3	img4
num	211	215	238	408
6E	63	66	69	152
AVE	0.76	0.72	0.64	0.35
SD	0.42	0.54	0.54	0.20
ECD	920	1041	1192	1723

どを判別するようなシステムを組み込むことができるのではないかと考えられる。

6. まとめ

本稿では、角膜内皮細胞画像の特徴量自動抽出システムの構築を目的とし、システムの提案と検討を行った。提案システムでは、角膜内皮細胞画像から細胞領域を抽出し、抽出した細胞領域から特徴量の計測を行う。これらの過程を自動で行うために、細胞領域の抽出には GP を、特徴量抽出にはラベリング処理などを用いる。また、細胞領域分割に適した GP の評価関数の調査を行った。実験の結果、評価関数に重みを 0.25 ~ 0.5 とした細胞数誤差率を加える事でより正確に細胞領域を分割できると考えられる。今後、細胞数に関する制約条件の検討や重みの検討を行う必要がある。また、提案システムを用いて細胞領域画像から特徴量を自動で抽出できる事が確認できた。今後、特徴量の正確性について検討すると共に、特徴量を用いた細胞画像のクラスタリングなどを検討していく必要がある。

参考文献

- [Koizumi 08] N.Koizumi, *et al*: Cultivated corneal endothelialtransplantation in a primate: Possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine, The Journal of Cornea and External Disease, Vol. 27, pp.48-55,2008.
- [Carpenter 06] Carpenter AE, *et al*: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, Genome Biol, 2006, 7(10), R100, Epub 2006 Oct 31.
- [Michal] Dr.Michal D, *et al*: Image Processing with ImageJ, BIOPHOTONICS.
- [Hiroyasu 11] Hiroyasu.T,*et al*: An algorithm for cancer nest feature extraction from pathological images. Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE, pp. 3423-3426, 2011.
- [布川 11] 布川 将来人, *et al*: 進化的画像処理を用いた細胞抽出の検討, 第 5 回進化計算シンポジウム 2011,pp.75-79,2011.
- [Koza 92] J.Koza: Genetic programming,on the programming of computers by means of natural selection, MIT Press, 1992
- [Nagao 97] T. Nagao S. Masunaga: Automatic generalization of image transformation processes using genetic algorithm. Proceedings of the IWANVMT- 97, pp. 101-106, 1997.
- [Goldberg 89] D.E.Goldberg: Genetic algorithms in search; optimization; machine learning, AddisonWesley, 1989
- [Sonka 94] M. Sonka: Image Processing, Analysis and Machine Vision, (Chapman & Hall), London, 1994.
- [Tinena 09] F. Tinena, *et al*: On quality assessment of corneal endothelium and its possibility to be used for surgical corneal transplantation.FUZZ-IEEE 2009, Korea, August 20-24, 2009.