フルカラー生体連続断面画像からの自動組織抽出法の検討

- 第二報: SVM によるウマ卵巣画像の領域抽出 -

竹本 智子^{*}[‡], 横田 秀夫[‡], 平野 悠子[§], 中村 佐紀子[‡], 木村 順平[#] 南保 泰雄⁺, 津曲 茂久[#], 三宅 陽一[§], 姫野 龍太郎^{*}[‡], 三島 健稔^{*}[‡]

> *埼玉大学大学院 理工学研究科 埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

*独立行政法人 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット 埼玉県和光市広沢2 - 1

> [#]日本大学生物資源科学部 獣医学科 神奈川県藤沢市亀井野 1866

⁺JRA 日高育成牧場 北海道浦河郡浦河町字西舎 535-13

[§]帯広畜産大学 獣医学科 北海道帯広市稲田町西 2-11

e-mail: satoko@me.ics.saitama-u.ac.jp

要旨 3D-ISM で取得した,生体試料のフルカラー連続断面画像からの組織領域の自動 抽出手法について述べる.大量のフルカラー連続画像に対しては,いかに領域抽出を 自動化できるかが大きな課題となっている.著者らはこれまで,任意の断面において 観察者が抽出領域を提示することにより,他の断面では自動抽出を実現する手法につ いて検討してきた.本稿ではパターン認識手法の1つである SVM を用いた自動抽出 手法について提案し,ウマ卵巣画像からの卵胞の自動抽出を行い,その結果を用いた 3次元モデルを構築した.

1. 始めに

我々のグループでは,生物の内部組織を対象とした3次元モデリングを行い,コン ピュータ内での構造解析を目指している.通常はX線CTやMRIなどからの画像が 用いられるが,我々は新しく開発した3次元内部構造顕微鏡(3Dimentional Internal Structure Microscope,以下3D-ISM)[1,2]からの画像を用いた研究を行っている. この装置からは,最小1μm間隔のフルカラー連続断面画像が取得可能であり,従来 は観察困難であった組織の構造解析も期待されている.本研究はこの3次元モデリン グに必要である,連続断面画像からの組織領域の自動抽出を目的とするものである.

著者らは現在,ウマ卵巣の内部構造を明らかにする研究を行っている.ウマの卵巣

は他の哺乳類と比べ,特異的な構造をしている.通常,哺乳類の卵巣内は主に皮質と 髄質に分けられ,内側を血管が配置する髄質,その外側を卵胞および黄体が配置する 皮質が覆っているが,ウマだけは皮質と髄質の位置が逆転している[3.4].しかし,ウ マの卵巣は他の哺乳類と比較し大型で,組織学的手法による内部観察が困難であるた め内部構造の理解が難しく,卵胞の発生や配置,成長の様子等がこれまで不明であっ た.一方,著者らは 3D-ISM で取得したウマ卵巣の画像から卵巣の3次元モデルを 構築し,内部構造の理解及び分析を行っている[5.6].モデル構築にはまず関心組織の 領域抽出が必要だが,大量のフルカラー連続画像に対していかに領域抽出を自動化す るかが大きな課題となっている.著者らはこれまで,任意の断面において観察者が抽 出領域を提示することにより,他の断面では自動抽出を実現する手法について検討し てきた.特に前回の報告では,卵巣内構造物の一つである卵胞の抽出手法について検 討し,大量の連続画像から半自動的に卵胞を抽出,その結果を用いて卵巣内部におけ る卵胞の空間配置を可視化することに初めて成功した[7,8].しかし,前回報告した 手法は,自動しきい値選定法[9]を用いた抽出領域の決定時に,近隣のパターンにより しきい値移動パラメータを定める必要があったため、パラメータが適切ではないとき には抽出に失敗し,結果として多くの断面で抽出領域の再提示が必要であるという問 題があった.そこで本報告では,パターン認識手法のうち最も識別性能の高い手法の 一つである SVM を用いることで、より精度の高い自動抽出を実現したので報告する.

2.実験材料の取得

サラブレット種の卵巣を,10%ホルマリン溶液にて固定後,凍結包埋剤(OCT コン パウンド:サクラ)と共に-80 下で凍結した.その後,3D-ISM により白色光源下 で30µmごとに切削しフルカラーの連続断面画像を取得した.図1にその一部を示す. 卵巣内部には卵胞,排卵窩,黄体様構造物,血管が認められ,それらを皮質が取り囲 んでいる.卵胞とは内部に卵細胞を擁する球形の細胞塊であり,卵巣内に多数存在す る.本研究では卵胞を対象とした自動抽出手法について検討した.(なお,ウマ卵巣 の解剖学的構造については,本冊子の「3次元内部構造顕微鏡装置(3D-ISM)を用 いたウマ卵巣内部構造の観察」を参照されたい.)

3. 領域抽出

連続断面画像中の任意の断面 *S_i*における関心組織の領域を *R_i*とする.このとき,隣 接する断面 *S_{i+1}*と断面 *S_i*の間隔は数µm であるため,断面間の関心組織の領域移動は 極小と考えられる.提案手法はこの特徴を利用し,断面 *S_i*における抽出領域 *R_i*に対し て断面間の領域移動を考慮した領域を,断面 *S_{i+1}*の抽出領域 *R_{i+1}*とすることで,連続 断面画像からの自動抽出を行う.手順を以下に述べる.

領域拡張型アルゴリズム

いま, S_i の抽出領域 $R_i \ge x, y$ 座標が同じ領域を, S_{i+1} における抽出の開始領域とする.このとき,図2に示すように開始領域の境界に8近傍で接し,かつ,現在までに開始領域内側に属する画素を,キュー(queue)を利用した一時データ構造Qに格納する.次に,Qから1画素pを取り出し,断面間の領域変化を経てpが関心組織の内と外,どちらのクラスに属するかを決定する.具体的には, S_i において $p \ge x, y$ が同座標の画素を中心とする局所的な領域を注目領域 $R_i \ge 0$ たとき, R_i 内の各画素はクラスが既知であるため, R_i から計測する特徴量を用いて適切な識別器を構成する.これによりpのクラスを決定し,開始領域に取り込むか,あるいは取り除く.次に,

1) 画素 *p* に 8 近傍で接する

2) 現在までに, *Q* には未格納 これら 2 つを満たし, かつ,

3) 画素 p が 関心 組織内のとき,現在までの 開始領域境界に対し外側 8 近傍で 隣接

4) 画素 p が関心組織外のとき,現在までの開始領域境界に対し内側 8 近傍で隣接

これらのいずれかを満たす画素を,新しくQに格納する.その後,Qから1画素取 り出し,同様の処理を繰り返す. S_{i+1} における処理は,Qが空になった時点での開始 領域を関心組織の領域として抽出して終了する.以上の処理は,関心組織の端断面(図 3: S_{start} , S_{end})まで自動的に繰り返す.なお,領域抽出の開始時には,ある任意の 断面 S_0 において観察者による抽出領域の設定が必要である.図4に処理の流れ示す. これらの処理は,領域拡張法(Region Growing[10])と類似した処理と考えることが できる.しかし,Region Growing は開始領域の拡張,または縮小の判断基準に何ら かのしきい値を必要とすることが多い.それに対して本手法は,近傍のパターンに基 づき判断基準を自動的に生成できる点で,部位によりパターンが変化することが多い 生体を対象とする場合には有利であると考えられる.



図1 3D-ISM によるウマ卵巣の連続断面画像(一部抜粋)



図4 各断面画像における領域抽出の流れ

SVM による識別器の構成

本手法では *p* のクラスを決定するための識別器として, サポートベクターマシーン (Support Vector Machine, 以下 SVM)[11]を用いる.SVM は, 現在知られている 中で最も優秀なパターン認識手法の一つである.SVM は, クラス分類の基準となる 識別関数(以下の式 1)を,

$$y = \mathbf{w}^T \cdot \mathbf{x} + b \tag{1}$$

図5に示すように分離超平面と入力データとの距離を最大化するようなwとbを求めることにより形成する.ここで,wは特徴ベクトルxに対する重み,bはバイアス項と呼ばれるパラメータである.SVM では,クラス間境界付近のデータ(これを,サポートベクトルと呼ぶ)のみに対し超平面を形成するので,少ない計算量で高次元のデータを扱える利点がある.また,線形分離不可能なデータにおいても,カーネル関数の導入により高次元の特徴空間に写像することで,非線形クラスの分類が可能になる特徴がある.

本手法は SVM に対し,注目領域 *R_i* から計測するテクスチャ,形状,色に関するの 18種の特徴量を導入する.テクスチャには,局所的な領域での1次モーメント(濃度平均,分散),重心周りの2次モーメント量を,以下の式2により求めた.

$$m_{pq} = \sum_{x} \sum_{y} x^{p} y^{q} f(x, y)$$
 (2)

ここでf(x, y)は,各画素を(x, y)としたときの階調値(ここでは,RGB 値), m_{pq} は画素(x, y)におけるf(x, y)の(p+q)次のモーメントを表しており,これを求める局所領域の大きさは5×5 画素とした.また,形状に関する特徴量には微分演算フィルタからの出力値を用いた.微分演算フィルタは,階調値が急激に変化する場所を輪郭として検出するものであり,変化値を出力する.本手法では微分演算フィルタに Sobelフィルタとラプラシアンフィルタを用いた.以上を RGB の各値に対して算出し,R,G,B 値と合わせて計 18 種の特徴量とし,注目領域 R_i 内のクラス情報に基づいてSVM による識別器を構成した.



図5 超平面による線形識別のイメージ

4.実験

提案手法によるウマ卵巣の連続断面画像からの卵胞の自動抽出について,以下の4つの実験を行った.

 実験1. 注目領域 R_iの大きさの検討

 実験2. 特徴抽出を行う色空間の検討

 実験3. 特徴抽出のための参照断面数の検討

 実験4. 実験1~3に基づく卵胞の自動抽出およびモデリング

実験1. この実験では,抽出精度に対する注目領域 *R_i*の大きさ(*W*×*W*pix.)の 影響を検証する.本手法は,テクスチャ,形状,色に関する18種の特徴量を画素値 から算出するが,本実験ではHSV色空間,CIEL*a*b*色空間に変換した画素値によ る特徴量についても検討を行った.なお抽出精度には,手作業による抽出結果との一 致度を以下の式3から求めた.

$$C(\%) = \frac{n(A \cap H)}{n(A \cup H)} \times 100 \tag{3}$$

ここで,Aは提案手法による抽出領域,Hは専門家の手作業による抽出領域,n(d)は 領域dに含まれる画素数である.一致度が100%に近いほど,提案手法による抽出が 専門家の抽出に近いことを意味する.実験対象は,109枚の断面に渡り存在する卵胞 (図6: follicle1)とし,卵胞のほぼ中央の断面で開始領域を提示した後, $\pm z$ 方向そ れぞれの連続断面に対し自動抽出を行った.検証するWは,W = 2n+1(但し, $2 \le n \le 6$)とした.図9~図11にその結果を示す.これらの結果より,W = 5,7では

 $\pm z$ 双方向でW = 9,11,13よりも抽出精度が低いことから, SVM の学習用サンプルとしてはW = 9,11,13のときより 不十分であったと考えられる.また,+z方向の抽出では 連続 40 枚程度まで,-z方向の抽出ではほぼ全体を通し てW = 9,11,13に明確な差が見られないことから、計算時 間を考慮しても本手法にはW = 9で十分であると考える.



実験2. この実験は,特徴量を算出する色空間の違いによる抽出精度の検証を目的とする.本実験では,注目領域 R_i の大きさは実験1の結果に基づき9×9pix.とした.なお,実験対象は実験1と同様である.図12に結果を示す.いずれの色空間も,約30断面以上に渡り90%程度の抽出精度が得られている.しかし,それ以降の断面については,+z方向の抽出ではRGB,-z方向の抽出ではHSVの抽出精度は他2つの色空間よりも低くなる.これは, $\pm z$ 双方向とも30断面以上では卵胞と周囲の皮質の色が酷似するため,識別が難しくなるためと考えられるが,一方でL*a*b*は他2つと比較し安定した抽出精度を獲得していることがわかる.

実験3. この実験では,特徴抽出のための Rの参照断面数が抽出精度に与える影響について検証する.前節まで述べた手法では,特徴抽出には隣接する1断面の Rのみを参照していた.それに対し本実験では,参照断面数を1~5として抽出精度の検証を行った.例えば,参照断面が3であれば,図7に示すように対象断面に隣接する3断面(R_{i-1} , R_{i-2} , R_{i-3})からの特徴を抽出する.なお,これまでの実験結果に基づき,注目領域 Rの大きさは 9×9 pix., 色空間は L*a*b*とした.実験対

象は実験1と同様である .図13に結果を示す. この結果より,全ての参照断面数について 30 断面付近までは90%程度の高い抽出精度を獲 得している.それ以降の断面では,参照断面 ごとに有意な差は見られなかったが,±z双方 向について考えた場合,最も安定した抽出精 度を獲得したのは参照断面数が3であったこ とがわかる.



図7 参照断面数3の場合

実験4.本実験では、これまでの実験結果から得た実験設定(表1)に基づき、follicle 1~follicle 3(図8)の3つの卵胞を対象に提案手法による自動抽出、および3次元 モデリングを行った.なお、follicle 2は112枚、follicle 3は36枚の断面に存在して おり、いずれも卵胞のほぼ中央の断面で開始領域を提示した後に、 $\pm z$ 方向それぞれ の連続断面に対して自動抽出を行った.図14に各卵胞についての抽出精度を示す. これらの結果から、各卵胞ともに、開始断面から全体の約70%までの断面では、抽 出精度が80%以上を維持していたことがわかる.

表1. 実験設定

注目領域の大きさ	色空間	参照断面数
9×9pix.	L*a*b*	3



次に、3次元画像解析ソフトウェア VoxelViewer(東芝機械)によるボリュームレン ダリングを行い、卵巣および卵胞のモデリングを行った、卵巣の領域は、背景領域を 固定しきい値により除去して抽出し、抽出領域に対して不透明度を $\alpha=5$ として設定 した.また、卵胞の領域の不透明度は $\alpha=255$ とした、これにより構築されるモデル は、半透明の卵巣内部に卵胞の空間配置を可視化したモデルとなる、巻頭カラーFig. 1に示す、また巻頭カラーFig.2~Fig.3は、提案手法による自動抽出と、専門家の 手作業による抽出結果による卵胞の3次元モデルを示している、今回の実験では、観 察者が提示する領域は1断面のみであったが、専門家の手作業による抽出結果とほぼ 変わらない可視化結果を獲得することができた。

5.おわりに

本稿では SVM による識別器を用いた,フルカラー連続断面画像からの関心組織領 域の自動抽出法を提案し,ウマ卵巣画像からの卵胞の自動抽出を行った.前回の報告 [7,8]では,自動しきい値選定法を用いた抽出領域の決定時に,近隣のパターンによっ てはしきい値の移動パラメータを定める必要があったのに対し,本手法は既に領域抽 出が終了した隣接断面の情報を教師とした識別器を自動生成することで,さらに精度 の高い抽出を実現し,観察者による抽出領域の提示回数を減らすことに成功した.今 後は,本手法の有効性と対象物の解剖学的構造の関係について検討を行う予定である.

謝辞

本研究の一部は,理研スーパー・コンバインド・クラスタ(RSCC)システムにより 遂行された.

参考文献

- [1] 小林賢知,樋口俊郎,青木勇 他:"3次元内部構造顕微鏡の開発",精密工学会誌, Vol. 61, No. 1, pp. 100-106 (1995).
- [2] 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎 他:"3次元内部構造顕微鏡による凍結生体試料の観察と計測", 低温生物工学会誌 Cryobiology and Cryotechnology, Vol. 44, No. 1, pp. 1-9 (1998).
- [3] Budras . K . D . , and S . Rock:"Atlas der Anatomie Des Pferdes", Hannover: Schlutersche-Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co . , pp . 76-77 (1997) .
- [4] Hafez, E. S. E., "Anatomy of female reproduction", Reproduction in farm animals 5th edn., Lea & Febiger, pp. 35-64 (1987).
- [5] J. Kimura, A. Tsukise, H. Yokota, et al.: "The Application of Three-Dimensional Internal Structure Microscopy in the Observation of Mare Ovary", Anatomia Hisotologia Embryologia, Vol. 30, pp. 309-312 (2001).
- [6] J. Kimura, Y. Hirano, S. Takemoto, et al.: "Three-Dimensional Reconstruction of the Equine Ovary", Anatomia Histologia Embryologia, Vol. 34, pp. 48-51 (2005).
- [7] 竹本智子,横田秀夫,平野悠子他:"フルカラー生体連続断面画像からの自動組織抽出法の検討・ウマ卵巣内部の可視化の試み",理研シンポジウム:生体形状情報の数値化及びデータベース構築研究,pp.45-55,理化学研究所埼玉,March 9(2005).

[8] 竹本智子,平野悠子, 横田秀夫 他: "生体フルカラー連続断面画像からの組織抽出法の検討(ウマ卵巣内構造物の可視化)", 画像電子学会誌, 第34巻, 第6号, pp. 770-777 (2005).

- [9] N . Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms", IEEE Trans . Sys . , Man, and Cybernetics, SMC-9, No . 1, pp . 62-66 (1979) .
- [10] 関口博之,佐野耕一,横山哲夫: "リージョングローイングをベースにした対話型3次元領 域抽出手法",信学論 D-,Vol. J76-D-,No. 2,pp. 350-657 (1993).
- [11] Vapnik, V.N.," The nature of Statistical Learning Theory ", Springer (1995).







図 10 注目領域 R_iの大きさに対する抽出精度の検討(L*a*b* 色空間)*



図 11 注目領域 R_iの大きさに対する抽出精度の検討(HSV 色空間)*

* 左: + z 方向 右: - z 方向











図 14 follicle 1~follicle 3 に対する抽出精度 *

* 左:+z方向 右:-z方向