

修士論文

深層学習セグメンテーションを用いたNK細胞の時系列動態解析

Time Series Dynamics Analysis of NK Cells Using Deep Learning
Segmentation

報告者

氏名：明神 拓歩

指導教員

星野 孝総 教授

令和8年2月19日

高知工科大学大学院工学研究科
基盤工学専攻電子・光工学コース

目次

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| 第1章 | 背景と目的 | 1 |
| 第2章 | 腹腔内貯留液の動画作成と画像処理解析プロセス | 3 |
| 2.1 | 腹腔内貯留液の時系列動画作成過程 | 3 |
| 2.2 | 腹腔内貯留液のNK細胞解析過程 | 4 |
| 2.3 | 細胞と背景の画素値の勾配差を利用した粒子形状測定法 | 5 |
| 2.4 | 免疫細胞測定パラメータ | 6 |
| 2.4.1 | 面積 (Area) | 6 |
| 2.4.2 | 周囲長 (Perimeter) | 7 |
| 2.4.3 | 円形度 (Circularity) | 8 |
| 2.4.4 | 移動速度 (Speed) | 8 |
| 第3章 | アーキテクチャ設計と検証方法 | 9 |
| 3.1 | 提案アーキテクチャ | 9 |
| 3.1.1 | FCN | 9 |
| 3.1.2 | FCN-ResNet50 | 10 |
| 3.1.3 | U-Net | 11 |
| 3.1.4 | SegNet | 12 |
| 3.2 | アーキテクチャの学習手法 | 13 |
| 3.3 | アーキテクチャ評価パラメータ | 14 |
| 3.3.1 | 真陽性 (TP : True Positive) | 14 |
| 3.3.2 | 真陰性 (TN : True Negative) | 14 |
| 3.3.3 | 偽陽性 (FP : False Positive) | 14 |
| 3.3.4 | 偽陰性 (FN : False Negative) | 15 |
| 3.3.5 | 重複率 (IoU : Intersection over Union) | 15 |
| 3.3.6 | 適合率 (Precision) | 16 |
| 3.3.7 | 再現率 (Recall) | 16 |
| 3.3.8 | 平均適合率 (AP : Average Precision) | 17 |
| 3.3.9 | 変動係数 (C.V. : Coefficient Variation) | 17 |
| 第4章 | ナチュラルキラー細胞の時系列形状特定実験 | 19 |
| 4.1 | 実験内容 | 19 |

| | | |
|------|-----------------------|----|
| 4.2 | 全結合型による実験結果 | 20 |
| 4.3 | エンコーダ・デコーダ型による実験結果 | 25 |
| 4.4 | 考察 | 28 |
| 第5章 | 外部検証における時系列細胞形状特定実験 | 31 |
| 5.1 | 外部検証 | 33 |
| 5.2 | 実験内容 | 33 |
| 5.3 | DNG 投与前後による NK 細胞の変化 | 34 |
| 5.4 | セグメンテーションアーキテクチャの測定結果 | 35 |
| 5.5 | 考察 | 37 |
| 第6章 | 結論 | 38 |
| 謝辞 | | 39 |
| 参考文献 | | 40 |

第 1 章 背景と目的

現代社会では、ライフスタイルの変化や環境要因により、女性の健康問題が増加傾向にある。特に月経困難症や子宮内膜症は、就業率や生活の質に大きな影響を与える社会的課題として注目されている。また、これらの疾患は慢性的な疼痛（とうふう）や過多月経による日常生活への制約をもたらし、医療資源や社会保障への負担も増大させる。こうした背景から、女性の健康維持と疾病予防は社会的にも重要な課題となる。

病気などに罹患（りかん）すると、免疫応答の脆弱性が顕在化することが多くの研究で指摘されている。なかでも子宮内膜症（内膜症）では、ナチュラルキラー（NK : Natural Killer）細胞 [1] の機能が低下することが確認されている。内膜症の発症メカニズムは未だ完璧には解明されていないが、Sampson が提唱した子宮内膜移植説 [2] や Meyer が提唱した体上皮化説 [3] などから月経血の逆流により外来抗原（細菌など）が腹腔内に流入することで、NK 細胞やマクロファージの免疫機能が抑制されると泉谷らが推察している [4]。このような仮説を検証するために、泉谷らが腹腔内貯留液を顕微鏡と CCD カメラを用いてタイムラプス撮影し、動画を生成した。その動画から腹腔内免疫細胞の動態をシャーレを用いて観察し、内膜症と非内膜症とで比較を行った結果、内膜症群における NK 細胞の平均移動速度が非内膜症群の約 50% にまで低下していることが明らかになっている [4]。しかしながら、得られた動画から個々の免疫細胞を解析するには多大な手間と時間がかかるのが現状である。特に、解析対象の周囲に複数の細胞が存在する場合には、従来の画像処理プロセスでは正確な解析が保証されないことも少なくない。

このような問題を解決するためには、細胞行動の定量的解析を支える画像処理におけるセグメンテーション技術の高度化が不可欠である。これまでの細胞セグメンテーションは、しきい値処理、輪郭追跡 [5–12]、Watershed 法 [13] などの古典的な画像処理が存在している。しかし、細胞形態が複雑で密集し、さらに時間的に変化する状況では、これらの手法は精度や再現性に限界がある。近年では、深層学習 (Deep Learning) を用いたセグメンテーションモデルの登場により、この課題が大きく前進している。特に、U-Net [14] に代表されるエンコーダ・デコーダ型の畳み込みニューラルネットワークは、生物医学画像における標準的手法として広く用いられており、核・細胞膜の抽出や細胞分裂の検出など、多岐にわたる応用が可能となっている。

AI 技術の進展に加え、顕微鏡によるタイムラプス撮影により、細胞集団の時間的変化や行動的多様性、そして可塑（かそ）性の観察が可能になっている。ここで言う可塑性と

は、細胞が観察期間中に停止、移動、形状変化などの行動を柔軟に切り替える能力であり、免疫細胞の機能にとって極めて本質的な特性である。免疫細胞の形態と運動性はその機能と直結しており、環境への応答や細胞間相互作用、攻撃・記憶といった多様な機能に関与している。こうした背景のもと、AIによるセグメンテーションやトラッキング技術の進展により、タイムラプス画像から得られる細胞の動態解析の効率化が進んでいる [15]。

このように細胞レベルでの動態把握が可能になったことは、病態解明のみならず治療薬の作用メカニズムの理解にもつながる。実際、子宮内膜症や月経困難症に対する治療の臨床的文脈では、合成プロゲスチンであるジエノゲスト（DNG : Dienogest）の投与が、長期的に不正出血が減少することを目的として併用されることがある [16]。DNGはプロゲステロン受容体に作用し、子宮内膜の安定化や免疫環境の改善を通じて、月経困難症の疼痛軽減のみならず、不正出血発生の減少にも寄与することが報告されている [16]。

本研究では、従来の画像処理とAIベースのセグメンテーションモデルを比較し、腹腔免疫細胞の解析効率を向上できるかを検討した。特に本研究では、NK細胞の移動速度ではなく、形態的特徴量である面積、周囲長や円形度などのパラメータに着目した。これらのパラメータは、細胞が時間の経過とともに示す行動様式と密接に関係しており、免疫機能の低下要因を特定する手がかりとなる可能性がある。さらに、本研究ではDNG投与後のNK細胞における形態的变化の違いについても解析する。加えて、セグメンテーションモデルの性能評価として重複率 (IoU : Intersection over Union)、適合率 (Precision)、再現率 (Recall)、平均適合率 (AP : Average Precision) を指標に、モデルの妥当性および画像特徴への適合性を検証した。

第2章 腹腔内貯留液の動画作成と画像処理解析プロセス

従来法における解析は、大きく2つの工程に分けられる。1つ目は、腹腔内貯留液を顕微鏡下でタイムラプス撮影し、その画像群を基に動画を作成する過程である。この工程により、腹腔内に存在する免疫細胞の動態を時間軸上で可視化することが可能となる。2つ目は、得られた動画からNK細胞を抽出し、その挙動を解析する工程である。解析対象となるNK細胞は、形態的特徴や移動様式に基づいて同定され、個々の細胞の動きや形態パラメータの変化を追跡することによって、免疫機能の評価が専門家によって行われる。また、解析対象となる各パラメータは、免疫細胞の形態と運動性との関係を明らかにするために重要な役割を果たす。

2.1 腹腔内貯留液の時系列動画作成過程

まず、腹腔内貯留液を顕微鏡下でタイムラプス撮影し、その画像群を基に動画を作成する過程について説明する。最初に、腹腔鏡下手術中に腹腔内貯留液を採取する。次に、この液体を1,500 rpmで7分間遠心し、上清と沈殿物に分ける。続いて、沈殿物にACK溶解緩衝液を加えて溶血を行う。溶血の目的は、白血球や腫瘍細胞、その他の有核細胞を観察する際に、画像のコントラストやフォーカスを安定させ、細胞の運動や挙動を明確に解析するためである。赤血球を除去することにより、細胞の動きがより鮮明に捉えられる。溶血後の沈殿物は、腹腔内貯留液の上清と混合し、再懸濁液を作製する。その後、この懸濁液を微小培養ディッシュに移し、CCDカメラを用いて30秒ごとに1枚の画像を撮影するタイムラプス撮影を行う。タイムラプスの撮影間隔を30秒に設定した理由は、肉眼で解析して認識できるレベルの情報であることと30秒に1枚の画像以上の画像を取得すると枚数が膨大になりデータ過多となるためである。撮影される画像は下の図2.1のような俯瞰画像であり、時系列で様々な細胞の動態を確認することができる。特に図2.1の赤枠で示されているのはNK細胞であり、本研究ではこのNK細胞の動態に着目して解析を行っている。

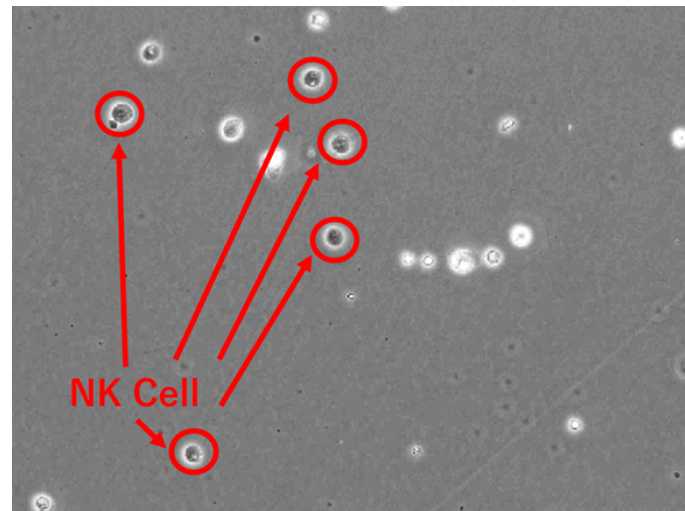


図 2.1 得られた俯瞰画像

2.2 腹腔内貯留液の NK 細胞解析過程

次に、腹腔内に存在する免疫細胞の動態を解析する過程について説明する。最初に、解析対象となる単独で存在する NK 細胞を特定する。次に、解析ツールを用いて、特定した単独の NK 細胞の時系列データを解析する。この解析では、NK 細胞の面積、周囲長、円形度、重心位置といったパラメータを数値化している。さらに、単独の NK 細胞の画像、NK 細胞の 2 値化面積画像、および NK 細胞の輪郭画像も取得している。従来の解析法では、細胞と背景の画素値の勾配差 [17] を利用して細胞を認識して解析を行っている。しかし、この手法では、細胞同士が密集していたり重なったりする場合に、正確な解析が難しくなることがある。特に、細胞同士が重なっている場合、解析結果が不確定となるため、重なる前までの動態のみを解析対象とする。

これらの課題を克服するために、本研究では深層学習に基づく画像セグメンテーション手法を提案する。特に、U-Net や SegNet といったエンコーダ・デコーダ構造を持つアーキテクチャは、医療画像や細胞画像におけるノイズ耐性と精密な輪郭抽出に優れ、従来の勾配ベースの手法では困難であった状況でも高精度なセグメンテーションが可能である。U-Net[14] はスキップコネクションにより低レベルの境界情報と高レベルの特徴量を統合できるため、輝度のばらつきや背景の不均一性が存在する腹腔内画像においても細胞領域を安定して抽出できる。また、SegNet[18] は符号化されたプーリング情報を復元時に利用する構造を持ち、細胞が密集する場面でも輪郭形状を損なわずに分離することが可能である。

これにより、従来法では解析が困難であった細胞が密集しているときや他の細胞が同じ画像内に存在する時系列データにおいても、個々の NK 細胞を継続的に追跡し、面積

や形態パラメータを定量化できるというメリットが得られると考えられる。さらに、AIによる自動セグメンテーションの実現により、解析者が手動で輪郭を修正する必要が大幅に減少し、より長時間の動態解析や多数の細胞に対する膨大な解析をする可能性がある。このように、セグメンテーションアーキテクチャの導入は、腹腔内免疫細胞の動態解析の精度と効率を向上させ、従来法では到達できなかった解析領域の拡張に寄与するものである。

2.3 細胞と背景の画素値の勾配差を利用した粒子形状測定法

2.2において細胞と背景の画素値の勾配差を利用した粒子形状測定法 [17] における輝度断面の測定とは、細胞の境界を輝度変化から定量的に捉えるための基本的な手法である。顕微鏡画像などでは通常、細胞内部と背景では画素の明るさ (輝度値) が異なり、境界部分で急激な変化が生じる。この輝度の変化を解析することで、細胞の輪郭を推定することが可能となる。

輝度断面とは、画像上のある直線に沿って画素の輝度値を一系列に取り出し、その値を位置に対してプロットしたものである。細胞を横切るように線を引いた場合、背景から境界を経て細胞内部へと進むにつれて、輝度値は高い値から低い値へと滑らかに、あるいは急激に変化する。この変化の傾きを調べることで、どの位置で明暗の変化が最も大きいかを判断できる。輝度値の変化率、すなわち勾配は、位置に対する輝度の微分として定義される。勾配が大きい箇所ほど、輝度の変化が急であり、そこが細胞と背景の境界である可能性がある。実際には、画像全体において輝度勾配を計算し、その大きさが最大となる点を輪郭候補として抽出する。これにより、明るさの差に基づいた輪郭推定が可能となる。

図 2.2 は、実際の顕微鏡画像中のある領域における輝度断面を示している。中央の画像には、NK 細胞が観察され、その上に縦 (赤線) および横 (青線) の断面位置が示されている。これらの線に沿って画素の輝度値を抽出し、一次元的にプロットしたものが右上および左下のグラフである。右上の赤いプロットは、 $X = 35$ における縦方向の輝度断面を示しており、縦軸は画素位置 (Y 軸座標)、横軸は輝度値を表している。一方、左下の青いプロットは、 $Y = 35$ における横方向の輝度断面を示している。いずれの断面においても、細胞内部では輝度が比較的一定であるのに対し、細胞境界付近では急激な輝度の上昇または下降が確認できる。これらの急変部分は、画像中でのエッジすなわち細胞輪郭に対応している。このように、輝度断面を用いることで、二次元画像中の局所的な輝度変化を一次元的に解析することができる。特に、輝度の極値や勾配の変化を定量的に評価することで、細胞の境界位置を精度良く推定することが可能となる。

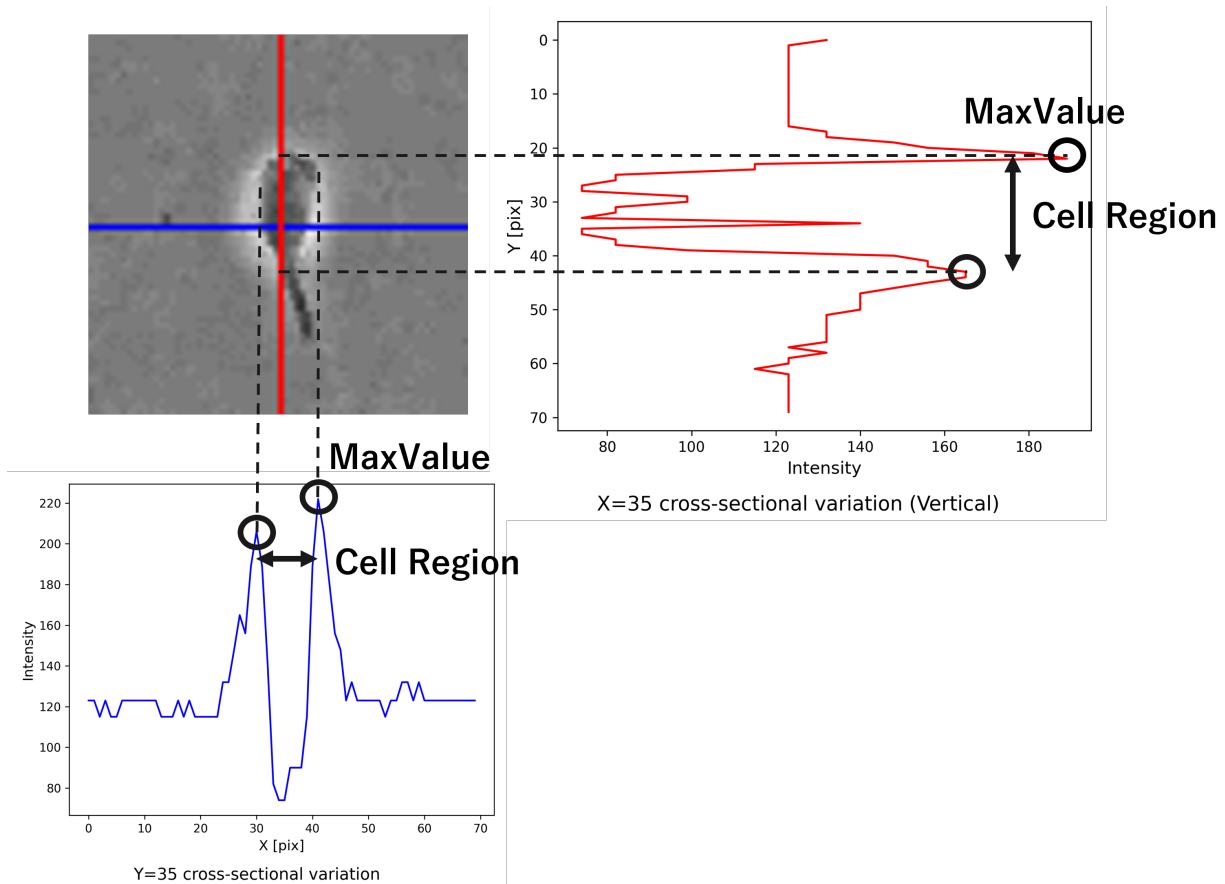


図 2.2 輝度断面を利用した輪郭推定法

2.4 免疫細胞測定パラメータ

次に、免疫細胞の測定に用いる形態学的および動的パラメータについて述べる。本研究では、免疫細胞の特性を定量的に評価するために、面積、周囲長、円形度、および移動速度を主要な指標として採用した。これらのうち、面積、周囲長、および円形度は細胞の形態的特徴を表す基本的な幾何学パラメータであり、細胞状態の把握において重要な指標である。移動速度に関しては時系列に関する形態特徴を示すパラメータである。

2.4.1 面積 (Area)

対象とする NK 細胞の面積を解析する目的は、細胞サイズの変化を定量化し、正常な NK 細胞と異常な NK 細胞との比較を可能にすることである。面積は、細胞形態を評価する上で基礎的かつ重要な指標の 1 つである。画像処理における面積の算出は、細胞輪郭で囲まれた領域を画素単位で計数する方法を用いた。輝度断面から取得された輪郭が、背景に隣接する N 個の頂点 (x_i, y_i) により表されるとする。このとき、2次元平

面上の点列 $(x_1, y_1), (x_2, y_2), (x_3, y_3), \dots, (x_N, y_N)$ を順に結んで構成される閉領域の面積 $Area$ は、式 (2.1) に示す理論式により算出される。一方、セグメンテーションモデルの出力は 2 値化画像である。2 値化画像 $I(x, y)$ の画素値は式 (2.2) のように定義される。このとき、細胞領域に対応する画素値の総和を求めることで面積を算出した。すなわち、 $Area_{\text{white}}$ は、白色で表される対象領域に属する画素の総和として定義され、その具体的な計算式を式 (2.3) に示す。画像は幅および高さから構成される 2 次元の離散画素空間上に定義されるため、面積は実数値ではなく整数値として出力される。したがって、本研究では画素単位での整数値として面積を評価することを基本とした。

$$Area = \frac{1}{2} \left| \sum_{i=1}^N (x_i y_{i+1} - x_{i+1} y_i) \right| \quad (2.1)$$

$$I(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{(白：細胞領域)} \\ 0 & \text{(黒：背景)} \end{cases} \quad (2.2)$$

$$Area_{\text{white}} = \sum_{x=0}^{W-1} \sum_{y=0}^{H-1} I(x, y) \quad (2.3)$$

2.4.2 周囲長 (Perimeter)

対象の NK 細胞の周囲長を求める目的は、細胞の形状変化を数値的に解析し、時系列で円に近づいているのか、または複雑な形状に変形しているのかを確認することである。特に、細胞が円に近づいている場合、活発に動いていないことが確認できる。この解析は、細胞の形態的な変化を評価するための重要なパラメータであり、細胞の運動性や活性の指標として使用される。周囲長の計算には、輪郭を構成する各頂点間のユークリッド距離を求め、それらの総和を取る方法を用いる。具体的には、細胞の輪郭を形成する N 個の頂点 (x_i, y_i) を順番に結んでいき、その隣接する頂点間の距離を計算した。 i は各頂点を表し、 $i = 1, 2, 3, \dots, N$ という範囲で変化する。隣接する頂点 (x_i, y_i) と (x_{i+1}, y_{i+1}) の間のユークリッド距離を求め、それを全ての頂点に対して総和することで細胞の周囲長を算出することができる。周囲長を求める理論式は式 (2.4) に示す通りであり、隣接する頂点間のユークリッド距離の総和を求める式である。この式において、 x_i および y_i は輪郭を構成する頂点の x 座標および y 座標を示し、 N はその頂点数を表す。

$$\text{周囲長 (Perimeter)} = \sum_{i=1}^N \sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2} \quad (2.4)$$

2.4.3 円形度 (Circularity)

円形度 (Circularity) は、画像中の物体の形状がどれだけ円に近いかを定量的に評価するための指標である。円形度は、物体が円に近いかどうかを示すため形状の滑らかさを反映した特徴量である。例えば、活発な NK 細胞は一般に円形度が低下するが、活発でない NK 細胞はほぼ円形である特徴があるため理論式で示すと、面積と周囲長を使って以下の式 (2.5) で表す。

$$\text{円形度 (Circularity)} = \frac{4\pi \times \text{Area}}{\text{Perimeter}^2} \quad (2.5)$$

2.4.4 移動速度 (Speed)

細胞の移動速度は、タイムラプス顕微鏡画像などを用いた画像解析によって定量的に評価することができる。まず、連続的に取得された画像系列から細胞位置をフレームごとに抽出する必要がある。一般的には、しきい値処理や輪郭抽出、あるいは機械学習ベースのセグメンテーション手法を用いて細胞領域を特定する。その後、各時刻における細胞の重心座標や特徴点をトラッキングし、時間軸に沿った位置変化を記録する。得られた座標データをもとに、隣接フレーム間のユークリッド距離を計算することで瞬間速度が算出でき、さらに一定時間にわたる平均速度や移動方向性を評価することが可能となる。すなわち細胞の重心位置を $\mathbf{p}(t) = (x(t), y(t))$ 、移動距離 $d(t)$ とした時に移動速度 $v(t)$ は式 (2.6) となる。

$$\begin{cases} d(t) = \|\mathbf{p}(t+1) - \mathbf{p}(t)\| = \sqrt{(x(t+1) - x(t))^2 + (y(t+1) - y(t))^2} \\ v(t) = \frac{d(t)}{\Delta t} \end{cases} \quad (2.6)$$

4つのパラメータは、細胞の行動様式を測定するのに基本的な要素である。これらの形態的特徴を高精度に解析・分類するためには、従来の画像プロセスでは限界があり、より高度な情報処理手法が求められる。近年、深層学習に基づく画像解析技術が急速に発展している。そのため、細胞画像解析における専用のアーキテクチャの設計をすることで解決したいと考えた。

第3章 アーキテクチャ設計と検証方法

3.1 提案アーキテクチャ

本章では、細胞セグメンテーションを対象として設計された複数のニューラルネットワークアーキテクチャを取り上げ、各アーキテクチャの設計思想、構成要素、および性能特性について比較検討する。対象とするアーキテクチャは、FCN32s, FCN16s, FCN8s, FCN-ResNet50, U-Net, および SegNet の 6 種類である。FCN32s, FCN16s, FCN8s は、初期の代表的なセマンティックセグメンテーションアーキテクチャとして提案されたモデルであり、基準モデルとして採用した。FCN-ResNet50 は、FCN に残差学習を導入した改良型アーキテクチャであり、特徴抽出性能の向上が期待されることから比較対象とした。また、U-Net は医療画像解析向けに設計されたエンコーダ-デコーダ型構造を有するモデルであり、SegNet はそれと構造的に類似したアーキテクチャであるため、医療画像分野における有効性を検証する目的で採用した。

3.1.1 FCN

まず、図 3.1 において FCN32s, FCN16s, FCN8s のアーキテクチャの構造を述べる。これらのモデルはいずれも画像分類用の畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を基盤として全結合層を畳み込み層に置き換えることで入力画像と同じ解像度の出力を得る Fully Convolutional Network (FCN) [19] であり、セマンティックセグメンテーションにおいて画素単位の分類を可能にしている。最も基本的な構造である FCN32s は、最後の 1×1 の畳み込みによってクラス分類画像に変換し、それを 32 倍にアップサンプリングすることで元の解像度に復元するが、この構成では空間情報が失われやすく、セグメンテーション結果の境界が粗くなる傾向がある。これに対して、FCN16s では FCN32s の出力に加えて中間層 (pool4) の出力画像を用いて補助的なクラス分類画像を生成し、16 倍のアップサンプリングの際に統合することで、より高精度な空間情報を反映した出力が可能となる。さらに、FCN8s ではこの手法を拡張し、より浅い層である pool3 の出力も統合することで、8 倍のアップサンプリング時に詳細な空間特徴を取り込むことができ、境界検出精度をさらに向上させている。このように、FCN32s から FCN8s にかけて段階的に浅い層の特徴マップを融合することで、セグメンテーションにおける出力の空

間的分解能および予測精度が着実に改善されるよう設計されている。本研究において FCN を採用した理由は、FCN がセマンティックセグメンテーションの初期における代表的なアーキテクチャであり、基礎的な手法として多くの後続モデルの出発点となっているためである。したがって、まず FCN を実装・評価することは、本研究におけるセグメンテーションモデルの基準として妥当であり、後述する他の手法との比較や拡張の土台として適していると考えた。

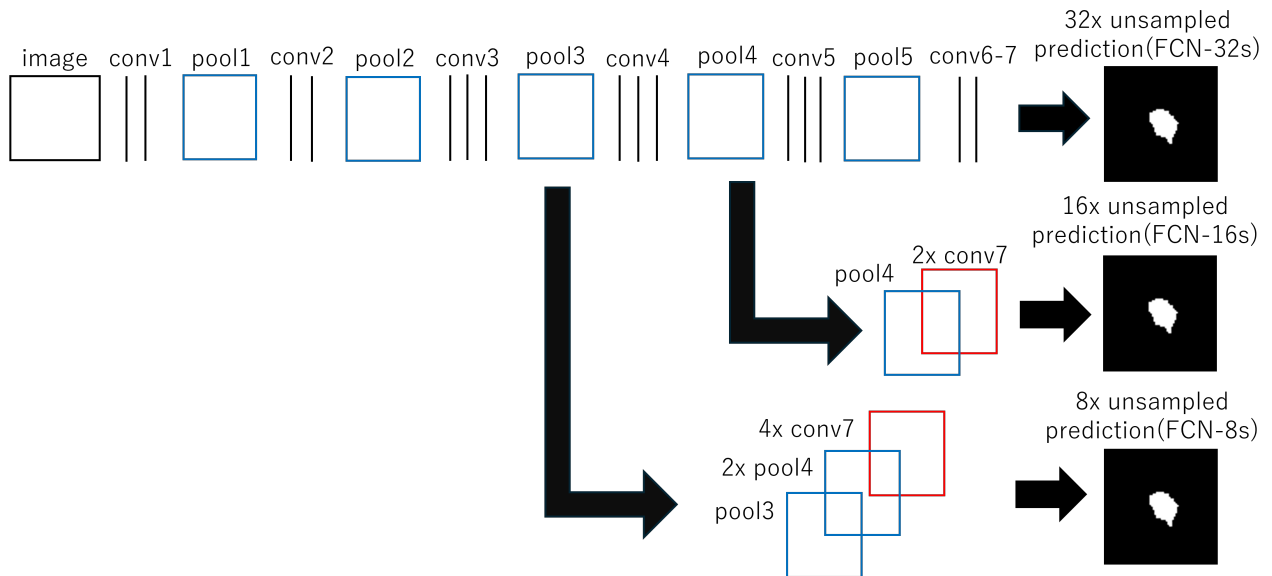


図 3.1 FCN のモデル構造

3.1.2 FCN-ResNet50

次に、FCN-ResNet50 のアーキテクチャについて述べる。図 3.2 の FCN-ResNet50 は、Fully Convolutional Network(FCN)[19] をベースとしつつ、背景に ResNet50[20] を採用することで、より深くかつ表現力の高い特徴抽出を可能にしたセグメンテーションアーキテクチャである。従来の FCN(FCN32s, FCN16s, FCN8s など) では VGG16 を背景として用いることが一般的であったが、VGG16 は層が浅く、高次の抽象的な特徴を十分に捉えきれないという課題があった。これに対して、ResNet50 は残差学習を導入した深層ネットワークであり、50 層という深さにもかかわらず勾配消失問題を抑えつつ学習が可能であるため、より複雑なパターンや構造の認識に優れている。FCN-ResNet50 では、ResNet50 を特徴抽出のエンコーダとして使用し、その最終層出力を 1×1 の畳み込みによりクラス画像に変換した後、上位の中間層の出力画像と統合しながら段階的にアップサンプリングを行う構造をとる。これは FCN8s におけるスキップ接続の考え方を引き継いでおり、浅い層の空間情報を取り入れることでセグメンテーション境界の精度

を高める工夫がされている。本研究では、既に基礎モデルとして FCN32s や FCN16s, FCN8s を用いて検証を行うが、より深い特徴抽出が可能な ResNet50 を背景とすることで精度向上が見込まれるため、FCN-ResNet50 もあわせて検証対象とした。

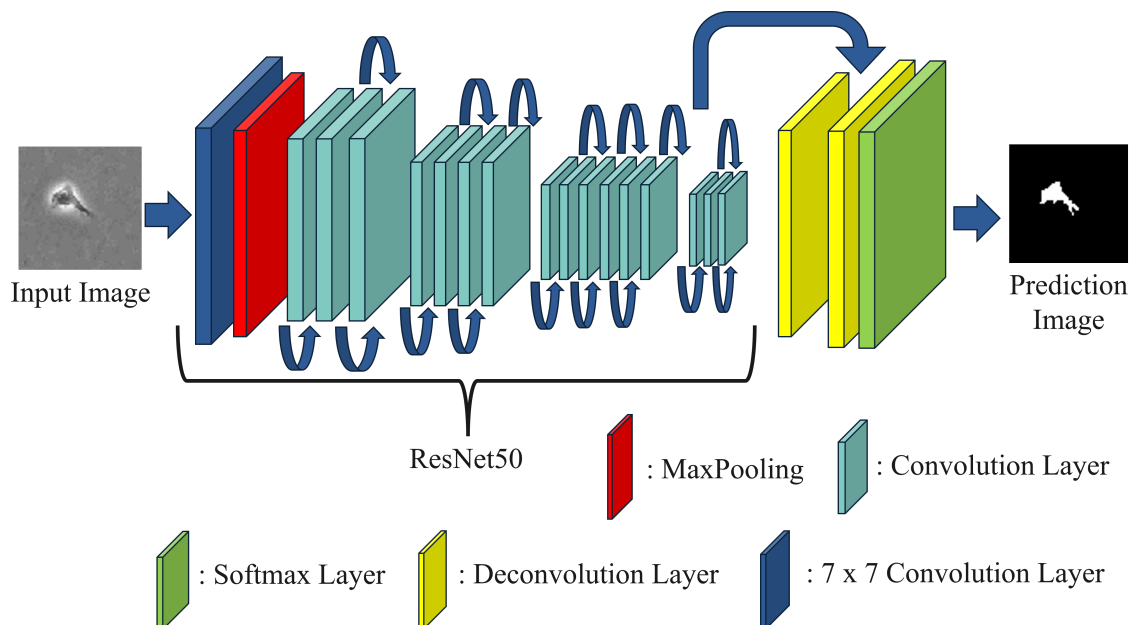


図 3.2 FCN-ResNet50 のモデル構造

3.1.3 U-Net

次に、セグメンテーションモデルにおいて、特に医用画像分野で広く用いられている図 3.3 の U-Net のアーキテクチャについて述べる。U-Net[14] は、エンコーダとデコーダから構成される左右対称のアーキテクチャを持ち、エンコーダ部分では、2つの 3×3 の畳み込み層と ReLU 活性化関数、 2×2 の最大値プーリング層を繰り返し適用することで、解像度を徐々に下げながら入力画像から意味的特徴を抽出する。一方、デコーダ部分ではアップサンプリングと 2×2 のアップコンボリューションにより特徴マップの解像度を段階的に復元しながら、対応するエンコーダの特徴マップとスキップ接続を行うことで、意味的情報と空間的情報の両方を保持した状態で出力を生成する構造である。さらに、各スキップ接続後には、2回の 3×3 の畳み込みと ReLU 活性化関数を適用してクラス画像を精緻化することで、細かな構造の認識にも対応可能である。最終的な出力層では 1×1 の畳み込みを適用して各画素ごとにクラス分類を行う。U-Net は、他のアーキテクチャよりデータ量が限られている状況でも高い性能を発揮できる点や、微細な構造の抽出に優れている点から、医用画像処理のみならず多くのセグメンテーションタスクにおいて広く用いられている。本研究においても、対象とする領域が明確であり、境界精度が特に重要となるセグメンテーションが求められているため、U-Net の構造は本目的に適合すると判断し、採用した。

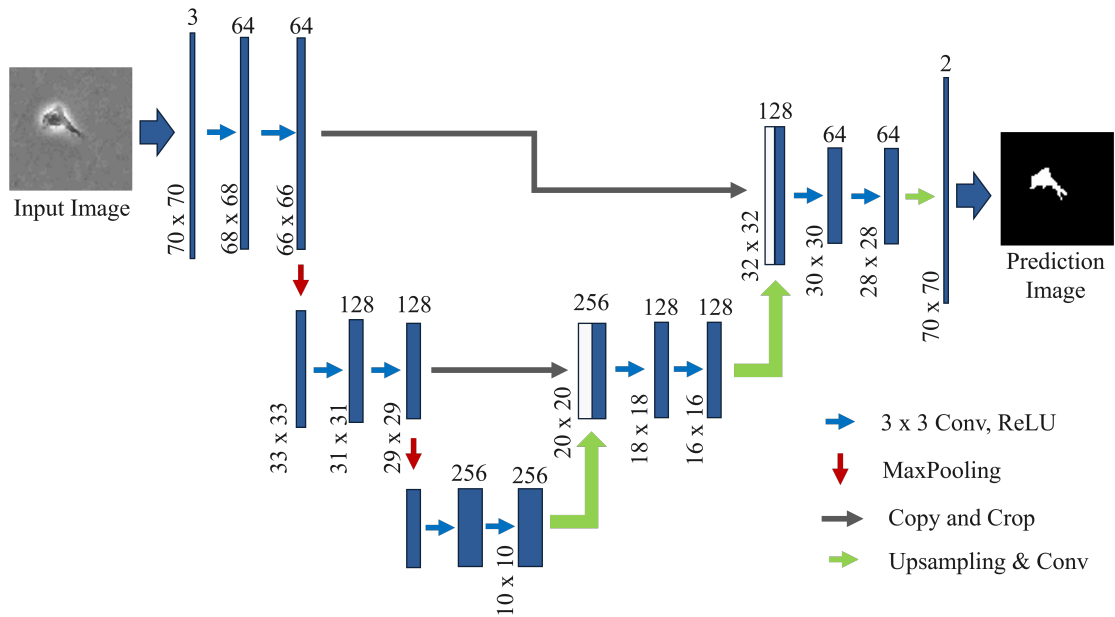


図 3.3 U-Net のモデル構造

3.1.4 SegNet

次に、セグメンテーションにおける SegNet[18] のアーキテクチャについて述べる。下の図 3.4 の SegNet[18] は、エンコーダとデコーダから構成されるアーキテクチャで、U-Net に似た左右対称の構造を持つが、その特徴的な点はデコーダのアップサンプリング時に、エンコーダで使用した最大値プーリングのインデックス情報を用いる点である。具体的には、エンコーダ部分では、複数の畳み込み層と最大値プーリング層を使用して特徴量を抽出し、解像度を徐々に低下させる。デコーダ部分ではアップサンプリングを行い、各ピクセルに対するプーリングのインデックス情報を利用して復元する。この手法により、空間的情報を正確に復元し、精密な境界の予測が可能となる。デコーダでは、アップサンプリング後に 2×2 の畳み込みを適用し、最終的に各画素に対するクラス予測を行う。SegNet は、特にプーリングインデックスを保存しておくことで、計算効率が良いことや学習速度が向上するという利点を持ち、医用画像や道路シーンのセグメンテーションなど、精密な境界が要求されるタスクにおいて有効である [21]。本研究においても、セグメンテーション対象の特徴が明確であり、特に精度と計算効率のバランスが重要であるため、SegNet のアーキテクチャは本目的に適していると判断して採用した。

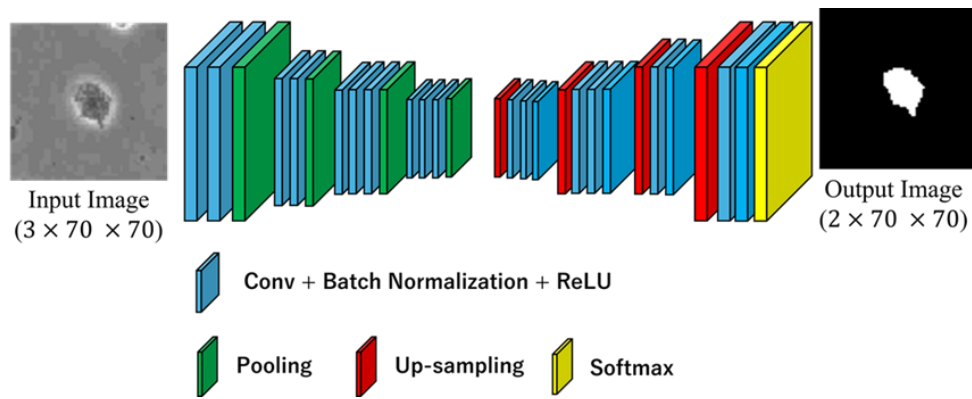


図 3.4 SegNet のモデル構造

3.2 アーキテクチャの学習手法

本研究では、セグメンテーションモデルの学習において、入力画像とそれに対応する正解画像を使用し、最適化手法として Adam を採用した。作成したセグメンテーションアーキテクチャでは、すべての畳み込み層においてパディングを行わないため、出力画像のサイズは入力画像よりも一定の幅だけ小さくなる。このため、最終層において線形補間を用いて、出力画像のサイズが入力画像と一致するように調整を行った。学習における損失関数には、各ピクセル単位で計算されるクロスエントロピーロスを使用した。クロスエントロピーロスは、セグメンテーションアーキテクチャが予測した確率と、正解との間の誤差を測定するための損失関数であり、以下の数式 (3.1) で示される。ここで、 $\mathcal{L}_{\text{CrossEntropy}}$ はクロスエントロピーロス、 Ω は画像内のすべてのピクセル位置の集合、 K はクラスの数を表す。 $y_k(x)$ は、位置 x における真のラベルがクラス k である場合に 1、それ以外は 0 となるワンホットベクトルであり、 $p_k(x)$ は、位置 x におけるクラス k の予測確率を示す。クロスエントロピーロスは、予測された確率と実際のクラスラベルとの間の誤差を評価する。具体的には、各ピクセルに対して予測確率が正しいクラスに高くなるように、間違っているクラスに対しては低くなるようにセグメンテーションアーキテクチャが学習される。この損失関数は、すべてのピクセルにおける誤差を合計し、最小化することを目指して訓練される。したがって、セグメンテーションアーキテクチャはクロスエントロピーロスが最小になるように、入力画像に対して正しいセグメンテーションを予測できるように学習される。クロスエントロピーロスは、特にセグメンテーションタスクのように各ピクセルを分類する問題において広く使用されており、予測確率と真のラベルとの乖離 (かいり) を直接的に最小化する方法として非常に効果的である。実際に本研究においても、クロスエントロピーロスと Adam を用いることで、細胞と背景の領域を高精度に識別できるセグメンテーションアーキテクチャの学習

が可能であると考えた。特に、細胞が密集している状態においても、誤分類を抑えた滑らかなセグメンテーションが得られることから、クロスエントロピーロス本研究の目的に適した損失関数であると判断した。

$$\mathcal{L}_{\text{CrossEntropy}} = - \sum_{x \in \Omega} \sum_{k=1}^K y_k(x) \log p_k(x) \quad (3.1)$$

3.3 アーキテクチャ評価パラメータ

これらのセグメンテーションアーキテクチャの選択と設計は、細胞画像解析の精度に大きな影響を与える。特に細胞セグメンテーションを目的としたタスクにおいては、モデルが細胞領域を正確に同定・抽出できる能力が極めて重要である。この性能を客観的に評価するために、重複度、適合率、再現率といった指標が一般的に用いられる。さらに、これらの指標を総合的に評価する平均適合率は、異なるモデルの検出能力を比較する上で重要な指標である。したがって、各セグメンテーションアーキテクチャの妥当性と適合性を客観的に評価することが必要である。

3.3.1 真陽性 (TP : True Positive)

真陽性とは、表 3.1 の左上のセグメンテーションアーキテクチャがある画像におけるピクセルを細胞であると判定し、その結果が実際の状況においても細胞であることと一致した場合を指す。これはモデルが細胞を正確に検出できた例として位置づけられ、検出性能を評価する上で重要な指標となる。

3.3.2 真陰性 (TN : True Negative)

真陰性とは、表 3.1 の右下のセグメンテーションアーキテクチャがある画像におけるピクセルを背景であると判定し、その結果が実際の状況においても背景であった場合を指す。この指標は、モデルが不要な領域を誤って細胞として認識しない能力を示すものであり、検出における信頼性や誤検出率の評価に寄与する。

3.3.3 偽陽性 (FP : False Positive)

偽陽性とは、表 3.1 の左下のセグメンテーションアーキテクチャがある画像におけるピクセルを細胞であると判定したものの、実際には背景であった場合を指す。この現象は、背景領域を過剰に細胞として検出してしまう性質を反映しており、モデルの選択性や誤認識傾向を評価する上で重要な指標となる。

3.3.4 偽陰性 (FN : False Negative)

偽陰性とは、表 3.1 の右上のセグメンテーションアーキテクチャがある画像におけるピクセルを背景であると判定したにもかかわらず、実際には細胞が存在していた場合を指す。この誤判定は、検出すべき細胞を見落とすことを意味し、モデルの感度や検出漏れに関わる性能評価において特に注意すべき点となる。

表 3.1 本研究における混同行列 (Confusion Matrix)

| | Positive (予測 : 細胞) | Negative (予測 : 背景) |
|--------------------|--|--|
| Positive (実際 : 細胞) | 真陽性 (TP : True Positive) 細胞と予測, 実際も細胞 (予測 = 1, 実際 = 1) | 偽陰性 (FN : False Negative) 背景と予測, 実際は細胞 (予測 = 0, 実際 = 1) |
| Negative (実際 : 背景) | 偽陽性 (FP : False Positive) 細胞と予測, 実際は背景 (予測 = 1, 実際 = 0) | 真陰性 (TN : True Negative) 背景と予測, 実際も背景 (予測 = 0, 実際 = 0) |

3.3.5 重複率 (IoU : Intersection over Union)

重複率 (IoU : Intersection over Union) は、予測領域と正解 (Ground Truth) 領域の重なりを定量化する指標であり、細胞セグメンテーションの解析において極めて重要なパラメータである。細胞画像解析では、個々の細胞境界を正確に抽出することが求められるが、予測マスクと実際の細胞輪郭の一致度を評価するには、単純なピクセル精度のみでは不十分である。重複率は領域の空間的な一致度を適切に反映できる指標であり、特に微小な細胞群や高密度な領域では、予測がわずかにずれるだけでも生物学的に大きな影響を及ぼす可能性がある。そのため、重複率を用いることで、予測マスクの形状・位置・大きさが実際の細胞構造とどの程度一致しているかを正確に把握することができ、モデル性能の評価や比較において客観性を担保する有効なパラメータとなる。

図 3.5 は、正解領域 (Answer) と予測領域 (Prediction) の関係を模式的に示したものである。上段は両領域の共通部分 (Intersection) を表しており、赤枠の Answer と青枠の Prediction が重なる領域が緑色で示されている。これは、セグメンテーションにおいて正しく予測できた領域である。一方、下段は両領域の和集合 (Union) を示しており、緑色で示された部分は Answer または Prediction のいずれかに含まれる領域全体である。この和集合が重複率の分母となり、共通部分との比によって空間的な一致度が定量的に評価される。

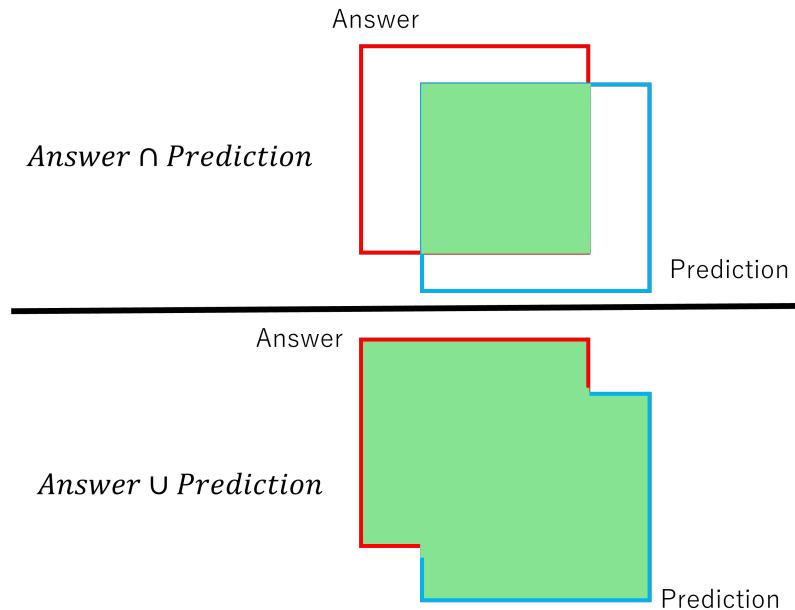


図 3.5 重複率 (IoU) の構造

3.3.6 適合率 (Precision)

適合率 (Precision) は、予測された細胞領域のうち、実際に正しい細胞として同定された割合を表す。これはセグメンテーションアーキテクチャの信頼性評価や、非細胞領域から生じる偽陽性 (False Positive, FP) の抑制において重要な指標である。高い適合率は、予測された領域のほとんどが実際の細胞に対応していることを示し、特に密集した細胞や判別が難しい画像に有用である。本研究では、信頼性の高いセグメンテーション性能を確保するため、適合率を主要指標として採用した。適合率は式 (3.2) で表すことができる。

$$\text{適合率 (Precision)} = \frac{\text{真陽性 (TruePositive)}}{\text{真陽性 (TruePositive)} + \text{偽陰性 (FalsePositive)}} \quad (3.2)$$

3.3.7 再現率 (Recall)

再現率 (Recall) は、セグメンテーションアーキテクチャが正しく検出した実際の細胞領域の割合を測定するものであり、偽陰性 (FN : False Negative) の影響を評価する上で重要である。細胞セグメンテーションでは、各ピクセルまたは領域を細胞または非細胞に分類する必要があるが、アーキテクチャが見逃した実際の細胞領域は偽陰性として扱われる。

再現率は、モデルがどれだけ効果的にすべての関連細胞領域を捉えているかを定量化することができる。高い再現率は、存在する細胞のほとんどが検出されていることを示

し、がん細胞の検出や細胞分裂解析のように、重要な細胞を見逃すことが科学的・臨床的価値を大きく損なう場合に特に重要である。再現率は次の式 (3.3) で定義される。

$$\text{再現率 (Recall)} = \frac{\text{真陽性 (TruePositive)}}{\text{真陽性 (TruePositive)} + \text{真陰性 (FalseNegative)}} \quad (3.3)$$

3.3.8 平均適合率 (AP : Average Precision)

平均適合率 (AP : Average Precision) は、適合率と再現率の関係に基づいて、セグメンテーションアーキテクチャの全体的な性能を単一のスカラー値として定量化する指標である。セグメンテーションタスクでは、各予測に割り当てられた信頼度スコアに基づき、閾値を変化させた際の適合率と再現率の変化を評価するために一般的に用いられる。

細胞セグメンテーションにおいては、再現率と適合率のバランスを取ることが重要である。適合率が高く再現率が低い場合 (多くの細胞が見逃される)、あるいは再現率が高く適合率が低い場合 (多くの偽陽性が生じる) では、正確な定量化や医療応用に十分なセグメンテーションとは言えない。平均適合率は、こうした相反関係を統合的に評価する効果的な指標である。

平均適合率は適合率と再現率曲線下の面積として定義され、連続的な定式化は式 (3.4)、離散近似は式 (3.5) で示される。平均適合率は、アーキテクチャの出力に基づき、さまざまな予測における適合率と再現率の相反関係を統合的に評価可能とする。細胞検出、核セグメンテーション、組織解析などの精度と網羅性の両方が求められる生物画像解析において、平均適合率は客観的な性能指標として広く利用されている。

$$\text{連続した平均適合率 } AP = \int_0^1 \text{適合率 (Precision)}(r) dr \quad (3.4)$$

$$\text{離散近似平均適合率 } AP = \sum_n (R_n - R_{n-1}) \cdot P_n \quad (3.5)$$

3.3.9 変動係数 (C.V. : Coefficient Variation)

セグメンテーションによって抽出された形態パラメータの集団内変動や、セグメンテーションアーキテクチャの出力のばらつき・信頼性の評価指標として、変動係数 (C.V. : Coefficient of Variation) が使用される。変動係数は、ある定量指標における標準偏差をその平均値で割ったものであり、単位やスケールの異なる特徴量間でも比較可能な相対的なばらつきの大きさを示す。この特性により、変動係数は細胞集団内における形態的異質性を定量的に評価する上で有用な指標となる。例えば、セグメンテーション結果から抽出された細胞面積のデータに対して、全細胞の平均面積と標準偏差を求め、それ

に基づいて変動係数を計算することで、集団全体のばらつきの度合いを評価できる。変動係数が高い場合は、細胞間での形態的ばらつきが大きく、これは細胞周期の非同期性、分化の段階差、あるいは薬剤応答などの影響を反映している可能性がある。一方、変動係数が低い場合は、細胞形態が比較的一様であり、均質な細胞集団が維持されていることを示す。

このように、細胞セグメンテーションと変動係数の組み合わせは、細胞形態の定量的評価を実現する解析アプローチであり、細胞抽出、表現型解析、組織工学、創薬研究などのさまざまな応用分野において重要な評価指標の1つである。

$$\text{変動係数 (C.V.)} = \frac{\text{標準偏差 (STD)}}{\text{平均値 (Average)}} \quad (3.6)$$

これらの評価項目はモデル性能を客観的に評価できるものである。次章ではモデルの性能向上を目的とした学習手法について詳述する。具体的には損失関数の設定や学習方法などを通じて検出精度の改善を図る。

第4章 ナチュラルキラー細胞の時系列形状特定実験

4.1 実験内容

この章では、実験の内容を説明する。データセットは、従来の解析法で取得した内膜症と非内膜症の動画からいくつかのNK細胞を選んで作成した。内膜症の俯瞰画像は図4.1(a)に示されており、その中でCell1からCell6のNK細胞に注目し、時系列画像(70×70[pix])を取得した。取得した画像枚数は表4.1に示す通りで、Cell1では1,816枚、Cell2では917枚、Cell3では947枚、Cell4では851枚、Cell5では861枚、Cell6では452枚、合計5,744枚となった。同様に、非内膜症の俯瞰画像も図4.1(b)に示されており、CellAからCellHのNK細胞に注目して時系列画像を取得した。取得した画像枚数は表4.1に示されており、CellAでは113枚、CellBでは125枚、CellCでは108枚、CellDでは102枚、CellEでは68枚、CellFでは82枚、CellGでは52枚、CellHでは166枚、合計816枚となった。今回のデータセットには、内膜症と非内膜症の合計6,560枚の画像が含まれている。

モデルの汎用性向上および過学習の防止を目的として、K分割交差検証法(K-Fold Cross Validation)[22, 23]を導入した。本研究では、データセットをそれぞれ $K = 3, 5, 7, 10$ に設定し、各条件においてセグメンテーションアーキテクチャの学習および検証を実施した。具体的には、データセットを K 個の等しいサブセットに分割し、各フォールドを一度ずつ検証用データとして使用し、残りの $K - 1$ 個を訓練用データとしてセグメンテーションアーキテクチャに学習させる。この手法を K 回繰り返すことで、すべてのデータが一度は検証に使用されることになり、性能評価の偏りを抑えることが可能となる。本研究では、 $K = 3$ の場合は各サブセットを2,186枚、 $K = 5$ の場合は1,312枚、 $K = 7$ の場合は937枚、 $K = 10$ の場合は656枚として各フォールドごとに10回の学習を行い、セグメンテーションアーキテクチャの出力を取得・保存した。これらの出力結果を統合することで、全体のデータに対するセグメンテーション性能を包括的に解析した。解析においては、各画像における細胞領域の形態的特徴量(面積, 周囲長, 円形度, 重心位置, 移動速度)に加えて、重複率, 適合率, 再現率や平均適合率といった性能評価指標を用いた。これにより、単に平均的なスコアに依存するのではなく、各評価データに基づいた多角的かつ信頼性の高い性能評価を行うことができる。さらに数値

的指標のみならず、出力画像と入力画像を重ね合わせた合成画像を作成し、目視による確認も併用した。これにより、セグメンテーションアーキテクチャが視覚的にも細胞領域を適切に抽出できているかを直感的に評価した。

表 4.1 内膜症・非内膜症データセットの各細胞獲得枚数

| 内膜症データセット | | 非内膜症データセット | |
|-----------|---------|------------|---------|
| 各細胞名 | 取得できた枚数 | 各細胞名 | 取得できた枚数 |
| Cell1 | 1,816 | CellA | 113 |
| Cell2 | 917 | CellB | 125 |
| Cell3 | 947 | CellC | 108 |
| Cell4 | 851 | CellD | 102 |
| Cell5 | 861 | CellE | 68 |
| Cell6 | 452 | CellF | 82 |
| | | CellG | 52 |
| | | CellH | 166 |
| 合計 | 5,744 | 合計 | 816 |

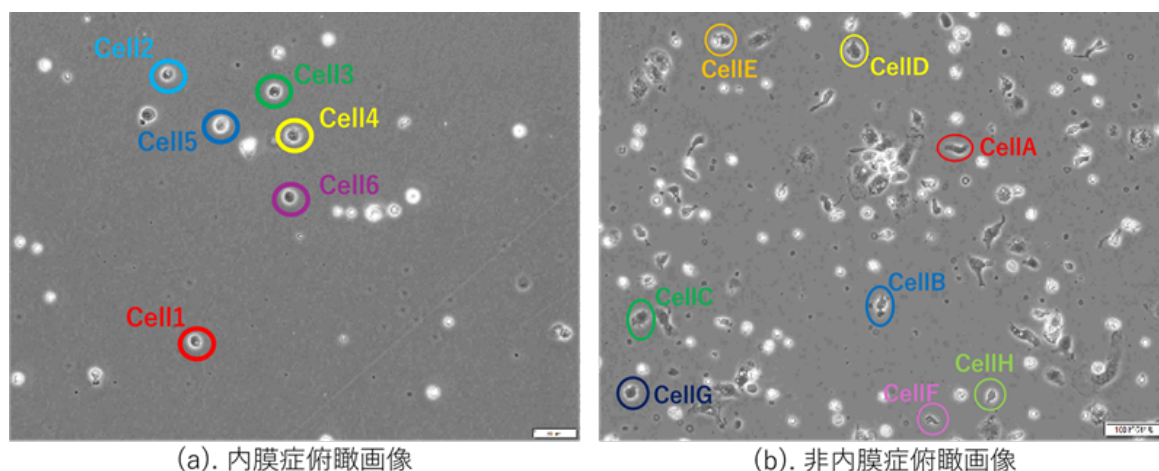


図 4.1 俯瞰画像から着目したNK細胞

4.2 全結合型による実験結果

次に、全結合型セグメンテーションアーキテクチャである FCN32s, FCN16s, FCN8s, および FCN-ResNet50 の結果について述べる。初めに FCN32s と FCN16s について図 4.2 と図 4.3 を確認すると 3 分割交差検証の FCN16s 以外のすべての分割交差検証の結果出力がひし形の輪郭を出力なのが確認できた。その結果、表 4.3 の面積や周囲長、円形

度の標準偏差と変動係数が他のセグメンテーションアーキテクチャより小さいことと表 4.4 のように重複率が 30%前後になり細胞を正確に捉えられないことが確認できた。 $K = 3$ の FCN16s でも細胞の特徴を捉える能力である重複率が他のセグメンテーションアーキテクチャより増加したが 40%前後と細胞を詳細に捉えることができないことを確認した。

表 4.2 FCN32s と FCN16s における各パラメータ解析結果

| モデル名 | 面積 (Area)[pix] | | 周囲長 (Perimeter)[pix] | | 円形度 (Circularity)[%] | |
|--------------------|----------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN32s($K = 3$) | 144.0 ± 12.3 | 8.56% | 43.56 ± 1.79 | 4.13% | 95.16 ± 1.13 | 1.20% |
| FCN32s($K = 5$) | 140.4 ± 10.1 | 7.17% | 43.58 ± 2.02 | 4.64% | 92.85 ± 2.82 | 3.04% |
| FCN32s($K = 7$) | 133.7 ± 26.6 | 19.86% | 41.85 ± 4.45 | 10.64% | 95.27 ± 2.47 | 2.60% |
| FCN32s($K = 10$) | 141.3 ± 11.0 | 7.81% | 43.19 ± 1.79 | 4.15% | 95.08 ± 1.46 | 1.54% |
| FCN16s($K = 3$) | 152.5 ± 103.6 | 67.94% | 46.93 ± 17.70 | 37.72% | 87.48 ± 17.47 | 19.97% |
| FCN16s($K = 5$) | 136.0 ± 16.5 | 12.16% | 42.45 ± 2.76 | 6.52% | 94.49 ± 0.88 | 0.93% |
| FCN16s($K = 7$) | 128.7 ± 16.8 | 13.09% | 41.11 ± 2.83 | 6.91% | 92.28 ± 1.39 | 1.47% |
| FCN16s($K = 10$) | 134.4 ± 6.9 | 5.14% | 41.78 ± 1.36 | 3.27% | 96.76 ± 2.71 | 2.81% |

表 4.3 FCN32s と FCN16s における適合率と再現率測定結果

| モデル名 | 適合率 (Precision)[%] | | 再現率 (Recall)[%] | |
|--------------------|--------------------|--------|-----------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN32s($K = 3$) | 65.42 ± 24.27 | 37.10% | 46.36 ± 21.78 | 46.99% |
| FCN32s($K = 5$) | 65.68 ± 24.31 | 37.01% | 45.46 ± 21.43 | 47.15% |
| FCN32s($K = 7$) | 66.70 ± 24.72 | 37.07% | 43.72 ± 21.69 | 49.61% |
| FCN32s($K = 10$) | 65.68 ± 24.31 | 37.02% | 45.76 ± 21.68 | 47.39% |
| FCN16s($K = 3$) | 73.18 ± 22.07 | 30.16% | 51.59 ± 25.54 | 49.50% |
| FCN16s($K = 5$) | 66.36 ± 24.59 | 37.05% | 44.41 ± 21.40 | 48.19% |
| FCN16s($K = 7$) | 67.36 ± 24.65 | 36.59% | 42.85 ± 21.16 | 49.39% |
| FCN16s($K = 10$) | 66.69 ± 24.45 | 36.67% | 44.36 ± 21.22 | 47.84% |

表 4.4 FCN32s と FCN16s における重複率と平均適合率測定結果

| モデル名 | 重複率 (IoU)[%] | | 平均適合率 (AP)[%] | |
|--------------------|---------------|--------|---------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN32s($K = 3$) | 36.20 ± 16.62 | 45.92% | 57.36 ± 17.83 | 31.09% |
| FCN32s($K = 5$) | 35.72 ± 16.44 | 46.01% | 57.06 ± 17.74 | 31.09% |
| FCN32s($K = 7$) | 34.70 ± 16.57 | 47.75% | 56.74 ± 17.78 | 31.34% |
| FCN32s($K = 10$) | 35.91 ± 16.61 | 46.27% | 57.21 ± 17.82 | 31.16% |
| FCN16s($K = 3$) | 43.73 ± 22.44 | 51.31% | 63.64 ± 19.48 | 30.61% |
| FCN16s($K = 5$) | 35.16 ± 16.35 | 46.49% | 56.90 ± 17.75 | 31.20% |
| FCN16s($K = 7$) | 34.54 ± 16.62 | 48.12% | 56.66 ± 17.81 | 31.43% |
| FCN16s($K = 10$) | 35.42 ± 16.60 | 46.88% | 57.04 ± 17.82 | 31.25% |

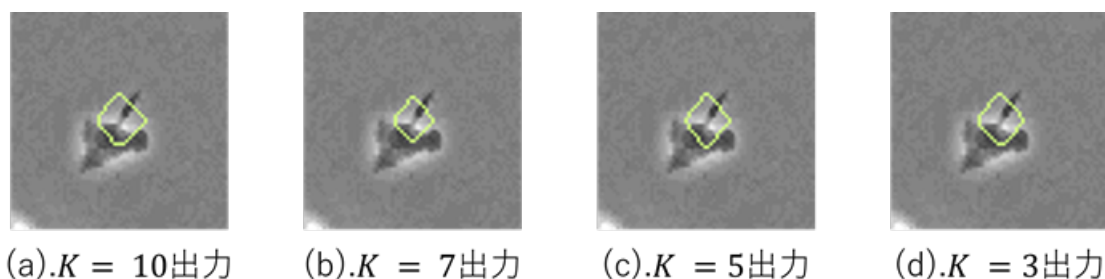


図 4.2 Cell2 の 454 フレーム目における FCN32s の輪郭出力

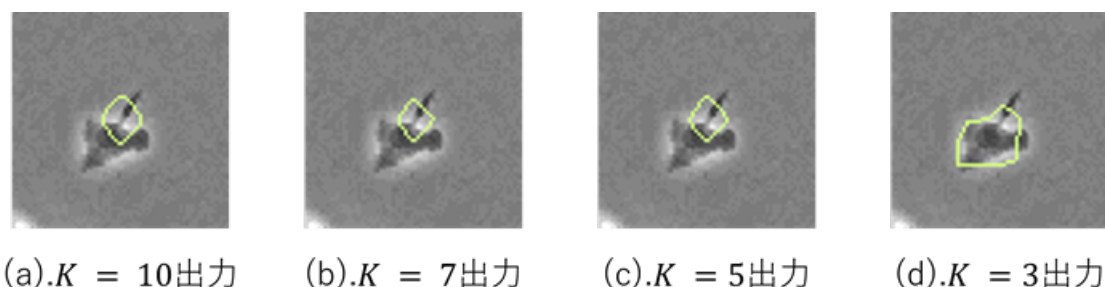


図 4.3 Cell2 の 454 フレーム目における FCN16s の輪郭出力

次に、FCN8s と FCN-ResNet50 の出力結果について述べる。表 4.5 に、FCN8s および FCN-ResNet50 における抽出領域の形状パラメータ（面積、周囲長、円形度）の解析結果を示す。FCN8s では、面積の平均値は 215.6[pix] から 237.4[pix] の範囲で推移し、周囲長は 63.39[pix] から 69.81[pix] であった。円形度の平均値は 64.14% から 70.91% を示した。一方、FCN-ResNet50 では、 $K = 3$ において面積および周囲長の平均値がそれぞれ 1138.2[pix]、120.86[pix] と他条件に比べて大きな値を示したが、 $K = 5$ から 10 では面積

が 210.2[pix] から 277.0[pix], 周囲長が 65.39[pix] から 69.43[pix] の範囲となった. 円形度の平均値は 63.51%から 73.78%であった.

表 4.6 に, 適合率および再現率の解析結果を示す. FCN8s では, 適合率の平均値は 83.87%から 88.28%, 再現率は 77.13%から 87.58%であった. FCN-ResNet50 では, $K = 3$ において適合率が 53.34%, 再現率が 69.80%となり, $K = 5$ から 10 では適合率が 71.76%から 88.46%, Recall が 76.17%から 84.20%であった. さらに表 4.7 に, 重複率および平均適合率の解析結果を示す. FCN8s では, 重複率の平均値は 68.03%から 78.90%, 平均適合率は 81.04%から 88.20%であった. FCN-ResNet50 では, $K = 3$ において重複率が 34.04%, 平均適合率が 63.09%を示し, $K = 5$ から 10 では重複率が 58.60%から 75.88%, 平均適合率が 74.62%から 86.72%の範囲であった.

最後に図 4.4 と図 4.5 でそれぞれのセグメンテーションアーキテクチャが細胞の輪郭を捉えることができたか目視で確認した. 図 4.4 では, FCN8s の結果を出力しており, 先ほどの FCN32s や FCN16s のセグメンテーションアーキテクチャより細胞を捉えることが確認できた. しかし, 画像を確認すると NK 細胞の偽足を捉えることができず細胞の本体のみを輪郭として出力していることも確認できた. 次に図 4.5 の FCN-ResNet50 の結果を示す. FCN8s より細胞本体も正確に捉えることができなかった.

表 4.5 FCN8s と FCN-ResNet50 における各パラメータ解析結果

| モデル名 | 面積 (Area)[pix] | | 周囲長 (Perimeter)[pix] | | 円形度 (Circularity)[%] | |
|--------------------------|-----------------|---------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN8s($K = 3$) | 226.2 ± 144.6 | 63.91% | 66.70 ± 23.95 | 35.91% | 66.11 ± 23.22 | 35.12% |
| FCN8s($K = 5$) | 230.6 ± 145.1 | 62.90% | 68.46 ± 24.55 | 35.87% | 64.48 ± 23.45 | 36.37% |
| FCN8s($K = 7$) | 215.6 ± 141.5 | 65.61% | 63.39 ± 24.56 | 38.75% | 70.91 ± 24.51 | 34.57% |
| FCN8s($K = 10$) | 237.4 ± 144.3 | 60.78% | 69.81 ± 24.58 | 35.21% | 64.14 ± 23.29 | 36.32% |
| FCN-ResNet50($K = 3$) | 1138.2 ± 1416.6 | 124.46% | 120.86 ± 105.21 | 87.05% | 73.78 ± 22.92 | 31.97% |
| FCN-ResNet50($K = 5$) | 210.2 ± 101.2 | 48.17% | 65.39 ± 21.90 | 33.50% | 66.47 ± 22.75 | 34.23% |
| FCN-ResNet50($K = 7$) | 277.0 ± 185.9 | 67.11% | 69.43 ± 26.74 | 38.52% | 70.78 ± 21.41 | 30.25% |
| FCN-ResNet50($K = 10$) | 224.0 ± 128.3 | 57.28% | 68.85 ± 24.67 | 35.53% | 63.51 ± 23.39 | 36.83% |

表 4.6 FCN8s と FCN-ResNet50 における適合率と再現率解析結果

| モデル名 | 適合率 (Precision)[%] | | 再現率 (Recall)[%] | |
|--------------------------|--------------------|--------|-----------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN8s($K = 3$) | 87.06 ± 8.82 | 10.13% | 81.63 ± 10.58 | 12.97% |
| FCN8s($K = 5$) | 88.11 ± 7.85 | 8.91% | 84.48 ± 10.56 | 12.50% |
| FCN8s($K = 7$) | 83.87 ± 13.78 | 16.43% | 77.13 ± 19.21 | 24.91% |
| FCN8s($K = 10$) | 88.28 ± 7.65 | 8.66% | 87.58 ± 8.38 | 9.57% |
| FCN-ResNet50($K = 3$) | 53.34 ± 35.89 | 67.28% | 69.80 ± 28.37 | 40.65% |
| FCN-ResNet50($K = 5$) | 86.48 ± 10.43 | 12.06% | 79.79 ± 12.20 | 15.29% |
| FCN-ResNet50($K = 7$) | 71.76 ± 23.67 | 32.99% | 76.17 ± 19.72 | 25.90% |
| FCN-ResNet50($K = 10$) | 88.46 ± 8.88 | 10.04% | 84.20 ± 10.05 | 11.94% |

表 4.7 FCN8s と FCN-ResNet50 における重複率と平均適合率解析結果

| モデル名 | 重複率 (IoU)[%] | | 平均適合率 (AP)[%] | |
|--------------------------|---------------|--------|---------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| FCN8s($K = 3$) | 73.09 ± 11.72 | 16.05% | 84.75 ± 7.95 | 9.39% |
| FCN8s($K = 5$) | 76.08 ± 11.54 | 15.17% | 86.64 ± 7.37 | 8.50% |
| FCN8s($K = 7$) | 68.03 ± 18.58 | 27.31% | 81.04 ± 13.99 | 17.27% |
| FCN8s($K = 10$) | 78.90 ± 10.81 | 13.71% | 88.20 ± 6.97 | 7.91% |
| FCN-ResNet50($K = 3$) | 34.04 ± 24.62 | 72.34% | 63.09 ± 13.90 | 22.03% |
| FCN-ResNet50($K = 5$) | 70.59 ± 11.68 | 16.54% | 83.69 ± 7.82 | 9.35% |
| FCN-ResNet50($K = 7$) | 58.60 ± 20.55 | 35.07% | 74.62 ± 17.12 | 22.95% |
| FCN-ResNet50($K = 10$) | 75.88 ± 10.81 | 14.25% | 86.72 ± 7.10 | 8.19% |

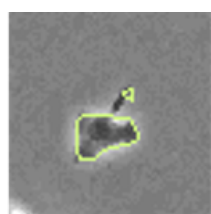
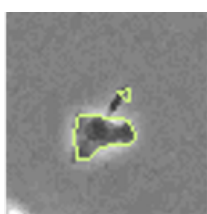
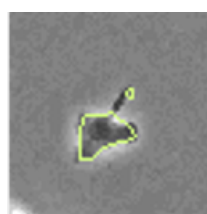
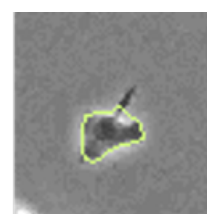
(a). $K = 10$ 出力(b). $K = 7$ 出力(c). $K = 5$ 出力(d). $K = 3$ 出力

図 4.4 Cell2 の 454 フレーム目における FCN8s の輪郭出力

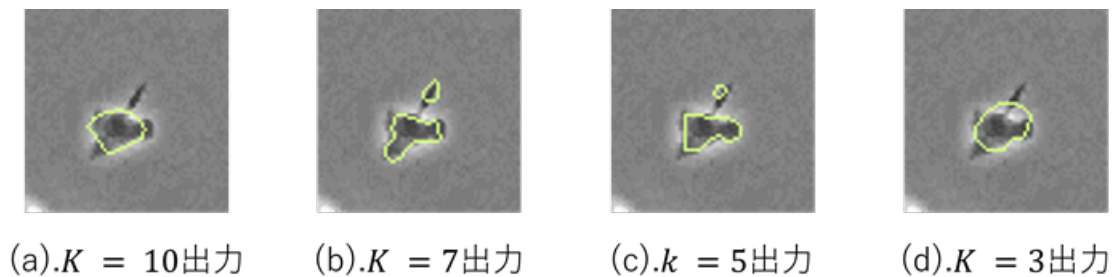


図 4.5 Cell2 の 454 フレーム目における FCN-ResNet50 の輪郭出力

4.3 エンコーダ・デコーダ型による実験結果

表 4.8 に、エンコーダ-デコーダ型モデルである U-Net および SegNet における形状パラメータ（面積，周囲長，円形度）の測定結果を示す．面積の平均値は，全ての K において U-Net と SegNet の間で大きな差は見られず，いずれのセグメンテーションアーキテクチャにおいても約 230[pix] 前後の値を示した．一方，周囲長は SegNet の方が全体的に大きい傾向を示し，特に $K = 5$ および $K = 10$ において高い値が確認された．円形度については，U-Net が 60%前後で推移したのに対し，SegNet は 55%から 58%程度と低い値を示した．

表 4.9 に，適合率および再現率の測定結果を示す．U-Net は K の増加に伴い適合率および再現率が向上する傾向を示し， $K = 10$ において最も高い値を確認した．SegNet は，全ての K において適合率および再現率が 90%前後で安定しており特に $K = 5$ において適合率 91.53%，再現率 90.48%と高い値を示した．変動係数についても，SegNet は U-Net と同程度またはそれ以下の値を示した．表 4.10 に，重複率 (IoU) および平均適合率 (AP) の測定結果を示す．重複率は，全ての K において SegNet が U-Net を上回る値を示した．特に SegNet($K = 10$) では重複率が 87.29%と最も高い値を示した．平均適合率 (AP) においても SegNet は一貫して高い値を示し，SegNet($K = 10$) では 93.29%に達した．U-Net では $K = 10$ において重複率および平均適合率が最大となったが，同条件下の SegNet の値を下回る結果となった．

最後に，図 4.6 と図 4.7 などを目視で実際に細胞セグメンテーションを確認した．図 4.6 の U-Net と図 4.7 の SegNet 共に先ほどの FCN の全結合層セグメンテーションアーキテクチャより複雑な細胞の形状をとらえることができた．特に全結合層セグメンテーションアーキテクチャにはできなかった偽足を捉えて細胞の複雑な形状を捉えることが確認できた．

表 4.8 エンコーダデコーダ型における各パラメータ解析結果

| モデル名 | 面積 (Area)[pix] | | 周囲長 (Perimeter)[pix] | | 円形度 (Circularity)[%] | |
|--------------------|----------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| U-Net($K = 3$) | 227.9 ± 135.4 | 59.40% | 69.87 ± 24.87 | 35.60% | 62.86 ± 24.23 | 38.56% |
| U-Net($K = 5$) | 230.7 ± 139.9 | 60.66% | 71.21 ± 25.10 | 35.25% | 60.94 ± 23.89 | 39.20% |
| U-Net($K = 7$) | 230.7 ± 138.8 | 60.15% | 70.37 ± 24.86 | 35.33% | 62.45 ± 24.12 | 38.63% |
| U-Net($K = 10$) | 237.1 ± 144.4 | 60.88% | 72.85 ± 25.52 | 35.04% | 59.99 ± 24.00 | 40.01% |
| SegNet($K = 3$) | 231.6 ± 139.0 | 59.99% | 74.25 ± 25.73 | 34.66% | 57.16 ± 23.78 | 41.61% |
| SegNet($K = 5$) | 232.4 ± 133.0 | 57.24% | 75.61 ± 25.59 | 33.86% | 55.53 ± 23.20 | 41.79% |
| SegNet($K = 7$) | 230.4 ± 140.7 | 67.07% | 73.51 ± 25.91 | 35.25% | 57.77 ± 23.98 | 41.51% |
| SegNet($K = 10$) | 233.1 ± 135.5 | 58.16% | 76.53 ± 26.42 | 34.52% | 54.63 ± 23.47 | 42.97% |

表 4.9 エンコーダデコーダ型における適合率と再現率測定結果

| モデル名 | 適合率 (Precision)[%] | | 再現率 (Recall)[%] | |
|--------------------|--------------------|-------|-----------------|--------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| U-Net($K = 3$) | 89.00 ± 8.64 | 9.71% | 85.41 ± 8.84 | 10.36% |
| U-Net($K = 5$) | 90.29 ± 7.58 | 8.40% | 87.32 ± 8.92 | 0.22% |
| U-Net($K = 7$) | 89.27 ± 8.61 | 9.65% | 86.43 ± 8.77 | 10.16% |
| U-Net($K = 10$) | 93.78 ± 6.50 | 6.93% | 92.44 ± 6.44 | 6.97% |
| SegNet($K = 3$) | 91.37 ± 8.27 | 9.06% | 89.13 ± 8.11 | 9.10% |
| SegNet($K = 5$) | 91.53 ± 8.05 | 8.80% | 90.48 ± 7.45 | 8.23% |
| SegNet($K = 7$) | 91.53 ± 8.31 | 9.09% | 88.54 ± 9.65 | 10.91% |
| SegNet($K = 10$) | 90.16 ± 7.22 | 8.00% | 89.33 ± 7.40 | 8.28% |

表 4.10 エンコーダデコーダ型における重複率と平均適合率測定結果

| モデル名 | 重複率 (IoU)[%] | | 平均適合率 (AP)[%] | |
|--------------------|---------------|--------|---------------|-------|
| | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 | 平均 ± 標準偏差 | 変動係数 |
| U-Net($K = 3$) | 77.28 ± 9.95 | 12.87% | 87.54 ± 6.67 | 7.63% |
| U-Net($K = 5$) | 79.86 ± 9.72 | 12.17% | 89.09 ± 6.30 | 7.07% |
| U-Net($K = 7$) | 78.28 ± 9.78 | 12.50% | 88.16 ± 6.52 | 7.40% |
| U-Net($K = 10$) | 81.48 ± 8.88 | 10.90% | 89.98 ± 5.66 | 6.30% |
| SegNet($K = 3$) | 82.30 ± 9.67 | 11.76% | 90.50 ± 6.35 | 7.02% |
| SegNet($K = 5$) | 83.63 ± 9.42 | 11.26% | 91.24 ± 6.17 | 6.76% |
| SegNet($K = 7$) | 81.93 ± 10.67 | 13.03% | 90.32 ± 6.76 | 7.49% |
| SegNet($K = 10$) | 87.29 ± 8.54 | 9.78% | 93.29 ± 5.34 | 5.72% |

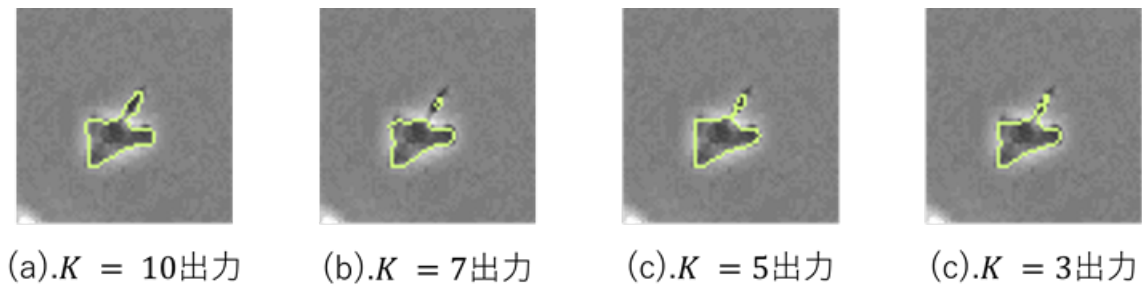


図 4.6 Cell2 の 454 フレーム目における U-Net の輪郭出力

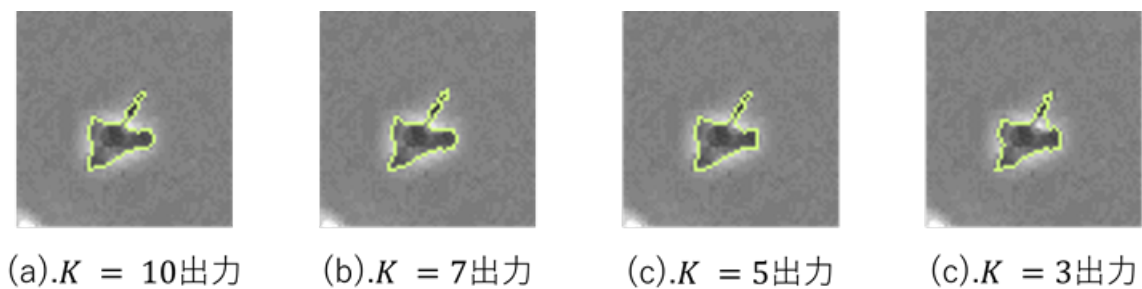


図 4.7 Cell2 の 454 フレーム目における SegNet の輪郭出力

さらに、正確な NK 細胞の動態 (正解) と $K = 5$ の U-Net と SegNet において時系列の各細胞について移動速度を測定した結果が下の表 4.11 に示す。測定の結果、内膜症の NK 細胞では Cell2, Cell3, Cell4 と Cell6 が活発に移動していることが数値的に確認できた。さらに、U-Net や SegNet のセグメンテーションアーキテクチャも活発に活動している NK 細胞を捉えていることが確認できた。非内膜症の NK 細胞でも活発に活動している NK 細胞とあまり変化のない NK 細胞を正確に捉えて追従することが確認できた。

表 4.11 各細胞の連続フレーム移動速度測定結果

| 細胞名 | 正解 (Ground Truth) | | U-Net($K = 5$) | | SegNet($K = 5$) | |
|-------|-------------------|---------|------------------|---------|-------------------|---------|
| | 平均 \pm 標準偏差 | 変動係数 | 平均 \pm 標準偏差 | 変動係数 | 平均 \pm 標準偏差 | 変動係数 |
| Cell1 | 2.48 \pm 1.77 | 71.46% | 2.29 \pm 1.70 | 74.43% | 2.18 \pm 1.62 | 74.20% |
| Cell2 | 3.73 \pm 5.20 | 139.49% | 3.81 \pm 5.29 | 138.75% | 3.65 \pm 5.22 | 143.01% |
| Cell3 | 3.84 \pm 6.82 | 177.38% | 3.79 \pm 6.88 | 181.14% | 3.78 \pm 6.84 | 180.77% |
| Cell4 | 6.81 \pm 9.24 | 135.60% | 6.75 \pm 9.30 | 137.82% | 6.72 \pm 9.28 | 138.12% |
| Cell5 | 2.39 \pm 1.84 | 76.98% | 2.29 \pm 1.81 | 79.02% | 2.36 \pm 1.88 | 79.67% |
| Cell6 | 5.61 \pm 11.56 | 205.78% | 5.48 \pm 11.62 | 212.10% | 5.57 \pm 11.60 | 208.17% |
| CellA | 1.81 \pm 0.98 | 54.24% | 1.76 \pm 1.01 | 57.12% | 1.73 \pm 0.97 | 55.89% |
| CellB | 3.34 \pm 2.10 | 63.06% | 3.32 \pm 2.18 | 65.67% | 3.19 \pm 2.04 | 63.85% |
| CellC | 3.52 \pm 3.82 | 108.41% | 3.66 \pm 3.83 | 104.65% | 3.59 \pm 3.88 | 108.07% |
| CellD | 1.85 \pm 0.91 | 49.38% | 1.70 \pm 0.90 | 53.30% | 1.69 \pm 0.86 | 51.10% |
| CellE | 1.86 \pm 1.30 | 69.85% | 2.15 \pm 1.59 | 74.32% | 2.07 \pm 1.40 | 68.01% |
| CellF | 3.60 \pm 3.63 | 100.93% | 4.71 \pm 6.62 | 140.55% | 3.70 \pm 3.58 | 96.69% |
| CellG | 1.71 \pm 0.86 | 50.46% | 1.59 \pm 0.91 | 57.68% | 1.53 \pm 0.86 | 56.74% |
| CellH | 4.56 \pm 8.28 | 181.44% | 4.54 \pm 8.26 | 182.07% | 4.49 \pm 8.27 | 183.93% |

4.4 考察

初めに、FCN32s および FCN16s における性能低下の要因について考察する。FCN32s と FCN16s はいずれも、大きな受容野と多数のプーリング層を使用しており、深層において空間情報の損失が生じ、ぼやけた出力および低い空間分解能を引き起こす。その結果、FCN は物体境界付近において局在性の低いセグメンテーションを生成する傾向があることが報告されている [24]。実際に、FCN が初めて提案された原論文においても、約 500×500 [pix] のデータセットを用いた実験では、FCN32s における平均重複率は 45.4%、FCN16s においても 59.4% と、比較的低い値を示している [19]。本研究においても、 70×70 [pix] のデータセットを用いた実験結果から、FCN32s および FCN16s の平均重複率はおよそ 30% から 40% 程度にとどまっており、いずれの分割検証においても同程度以下の精度に収束する傾向が確認された。

次に、FCN8s および FCN-ResNet50 が、FCN32s や FCN16s の全結合層セグメンテーションアーキテクチャより優れた性能を示した一方で、U-Net や SegNet といったエンコーダ・デコーダ型セグメンテーションアーキテクチャより精度が低下した原因について考察する。まず、FCN32s および FCN16s と比較して精度が向上した要因として、アップサンプリング手法自体は同一であることから、主な違いはエンコーダにおける畳

み込み層の構成およびスキップ接続の数にあると考えられる。特に、FCN8s ではより多くのスキップ接続を導入することで、浅層の高解像度特徴を保持したままデコーダに伝達できるため、情報損失を抑制しつつ復元が可能となり、その結果として複雑な細胞形状をより適切に捉えることができたと考えられる。一方で、U-Net や SegNet などのエンコーダ・デコーダ型セグメンテーションアーキテクチャと比較して精度が低下した要因としては、アップサンプリング手法の違いが挙げられる。U-Net や SegNet では、畳み込み層を用いながら段階的に特徴マップを復元することで、最終的に元の画像サイズ (70×70 [pix]) へと出力を再構成している。これに対して、FCN のセグメンテーションアーキテクチャでは、エンコーダの出力特徴マップを線形補間によって一度に元の画像サイズへ拡大するため、復元過程における特徴表現の再学習が行われず、細胞の複雑な境界構造を十分に捉えることが困難であったと考えられる。

次に U-Net おいて細胞の複雑な形を捉えることができた原因について考察する。初めに U-Net では、もともと医療用の細胞を捉えることを目的として提案されているモデルである [14]。さらに、U-Net の原著論文では、ISBI Cell Tracking Challenge 2014/2015 の PhC-U373 データセット [25] を用いた性能評価が報告されている。図 4.8 の PhC-U373 データセットは、ポリアクリルアミド基板上で培養され、位相差顕微鏡で撮影された膠芽腫星細胞腫 U373 細胞の画像から構成されている [25]。PhC-U373 細胞と本研究で対象とした NK 細胞の細胞タイプや機能は異なるが、画像解析の面ではいくつかの共通点がある。どちらのデータセットも明確な境界を持つ細胞を含んでおり、細胞は孤立した形で撮像されているため、セグメンテーションアーキテクチャの訓練と評価に適している。U-Net 原著論文 [14] において、U-Net は平均適合率 92% を達成し、2 位のアルゴリズム (83%) を大きく上回る性能を示した。本研究のデータセットにおいても、U-Net は平均適合率 81% と高いセグメンテーション精度を達成した。PhC-U373 の結果と比較してやや精度が劣るのは、画像解像度の違いによるものと考えられる。U-Net 原著論文 [14] では、PhC-U373 画像のサイズは 512×512 [pix] であるのに対して本研究で使用した画像は 70×70 [pix] と低解像度である。この大きな解像度の差が、細胞の輪郭や微細構造の検出能力に影響を及ぼし、細部情報の欠落によって予測精度がわずかに低下した可能性がある。それでもなお、U-Net は解像度に制約のある環境下においても、腹膜免疫細胞の形態解析において高い適応性を持つセグメンテーションアーキテクチャとしての要件を満たしていると考えられる。

SegNet が U-Net より細胞の輪郭を高精度に捉えることができた要因は、両セグメンテーションアーキテクチャの構造的な違いに起因すると考えられる。U-Net と SegNet の最も大きな相違点は、エンコーダとデコーダ間における情報伝搬の構造である。U-Net では、エンコーダで抽出された高解像度の特徴マップをスキップ接続によってデ

コーダに直接連結することで、詳細な空間情報を保持したまま出力を再構成することが可能である。一方、SegNet ではエンコーダの特徴マップ自体は伝搬せず、最大プーリング時の位置情報のみを保持し、デコーダにおいてそれらの位置情報と一つ前の層の出力特徴を用いて段階的に特徴を再学習する構造を採用している。この構造により、SegNet は空間的位置関係を安定的に復元できる一方で、過度な特徴伝搬を抑制する正則化効果が働き、小規模な入力画像や限られたデータセットにおいて高い汎化性能を示したと考えられる。

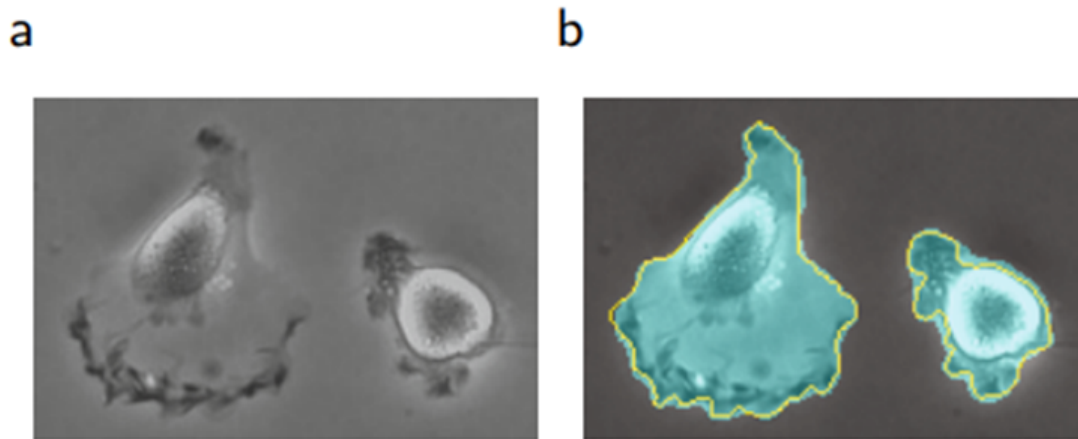


図 4.8 膠芽腫星細胞腫 U373 細胞とその輪郭画像

第5章 外部検証における時系列細胞形状特定実験

これまでの実験では交差検証によりセグメンテーションアーキテクチャの構築および評価を行ってきたが、対象は2つの動画から取得された細胞に限定されており、他の内膜症患者あるいは非内膜症患者から取得されたデータに対しても同様に適用可能であるとは限らない。そのため、外部検証を行うことでセグメンテーションアーキテクチャの汎化性能の確認と DNG 投与前後による NK 細胞の変化の確認を行う。

次に、DNG 投与前後の動画について説明する。DNG 投与前後の動画はいずれもタイムラプス撮影された動画で作成されているが、投与前と投与後ではそれぞれ独立した動画が作成されており、1つの連続した動画としては存在していない。そのため、投与前の動画に存在する NK 細胞が、投与後の動画にも同一個体として存在しているかどうかは不明である。したがって、DNG 投与前後の NK 細胞を比較するためには、各 NK 細胞を群ごとに比較する必要がある。

また、今までの動画と DNG 投与前後の動画の違いについて述べる。まず、図 5.1 のこれまでの内膜症患者の画像と投与前の画像を確認する。解析可能な NK 細胞を図 5.1(a) のこれまでの非内膜症の 1 フレームと図 5.1(b) の今回の非内膜症患者の 1 フレームでの比較を行った。比較すると単独で存在する NK 細胞の数が大きく違う点である。図 5.1(a) では単独で存在する NK 細胞が多く確認できるため解析が容易であるが図 5.1(b) の非内膜症の画像では、周囲に白い別の細胞が多くみられる。その細胞が 1 フレームごとに不規則に移動しているため対象の NK 細胞に隣接したり重なることが多く起こりえるため解析が容易ではない。また、図 5.2 のように正確に NK 細胞を取得できる機会が少なくなったこともこれまでのデータセットとの違いである。初めに図 5.2(a) では DNG 投与後の NK 細胞が時系列で偽足が大きく伸びた結果、これまでの単独で存在する NK 細胞を切り出す 70×70 [pix] を超えてしまう時には正確な解析が不可能になる。また、図 5.2(b) では、隣接する他の細胞や対象外の NK 細胞が対象の NK 細胞を切り出す画像サイズ (70×70 [pix]) に存在してかつ対象の NK 細胞より面積 [pix] が大きいときには輝度断面では多くの確率で失敗する。そのため今回の外部検証には汎化性能の信頼性を担保する重要な基準となる。

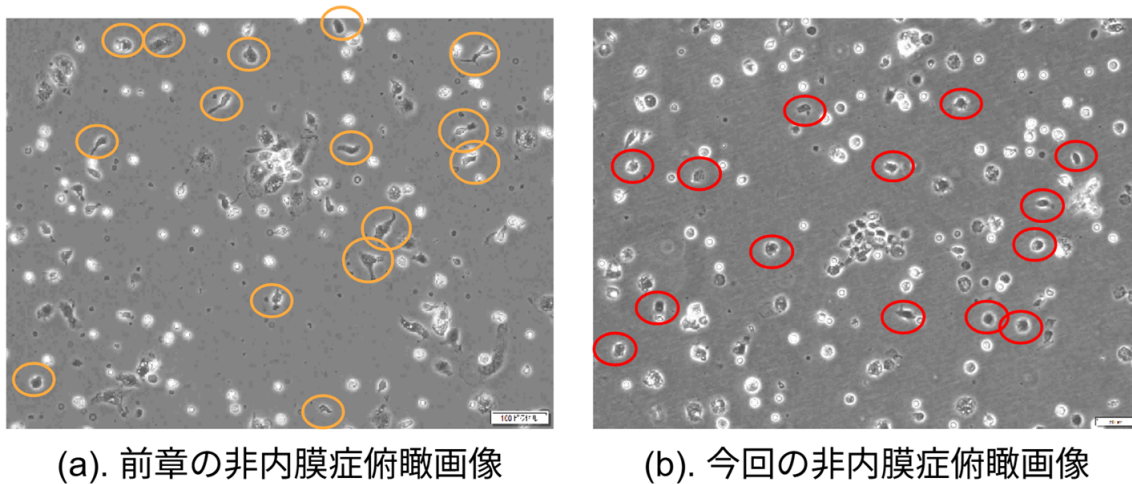


図 5.1 非内膜症患者の動画の1フレーム切り出し画像

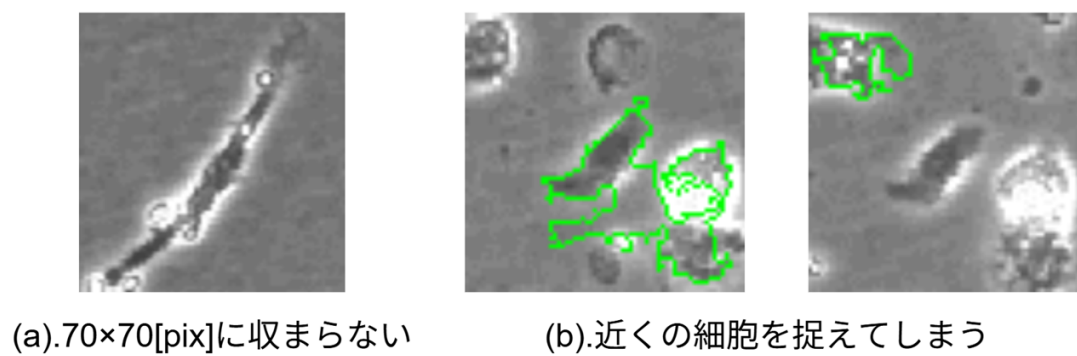


図 5.2 画像取得失敗例

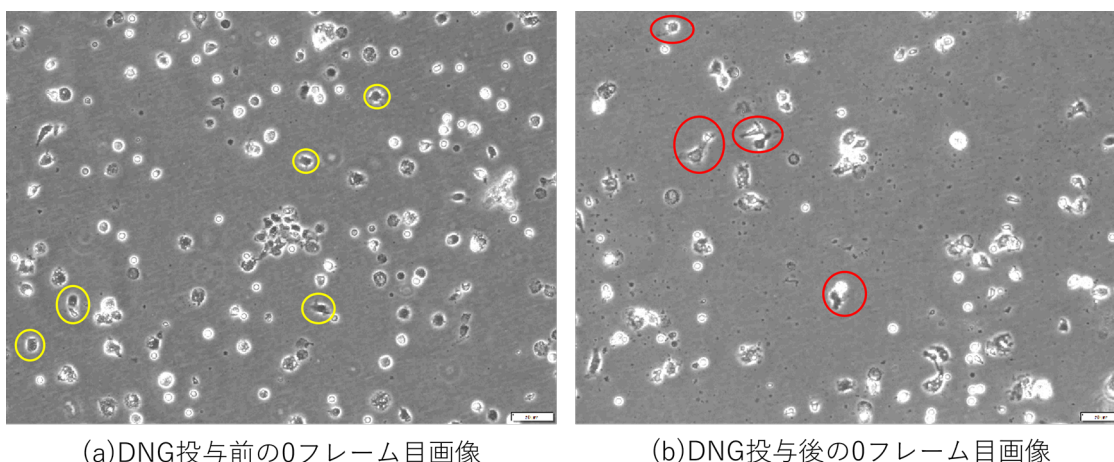
5.1 外部検証

外部検証 (External Validation) とは、ある研究によって得られた結果や仮説、統計モデルなどが、特定の条件や分析手順に依存した一時的なものではなく、より広い状況においても成立するかを確認することである。実証研究などでは、同一データ内で行う内部検証のみでは、結果を過度に楽観的に評価してしまう危険性がある。例えば、モデルの構築と評価を同じデータで行うと、偶然適合したパターンを有意な結果と誤認する可能性がある。そのため、独立した外部データを用いた検証が重要とされている [26]。医療・心理・社会科学分野では、異なる集団や背景においても結果が再現されるかを確認することで、研究成果の汎化性能が評価される [27]。このように、外部検証は研究結果の信頼性を高めるうえで不可欠なプロセスである。

5.2 実験内容

次に、外部検証における時系列細胞形状特定の実験内容について述べる。本研究で着目した動画を図 5.3 に示す。図 5.3 は、非内膜症患者における DNG 投与前後の動画である。図 5.3(a) には、DNG 投与前の 0 フレーム目の画像を示しており、黄色枠で囲まれた細胞が外部検証に使用した NK 細胞である。これらは合計 1,069 枚取得した。一方、図 5.3(b) には、DNG 投与後の 0 フレーム目の画像を示しており、赤色枠で囲まれた細胞を外部検証用の NK 細胞として合計 1,407 枚取得した。

外部検証では、5 分割交差検証により学習した SegNet および U-Net を用い、NK 細胞を正確に検出可能であるかを検証した。評価指標として、重複率、適合率、再現率および平均適合率を用いた。本実験では、DNG 投与前後の細胞群を比較することで細胞動態の変化を確認するとともに、各セグメンテーションアーキテクチャが NK 細胞をどの程度正確に特定可能であるかを評価した。



(a)DNG投与前の0フレーム目画像

(b)DNG投与後の0フレーム目画像

図 5.3 非内膜症患者の DNG 投与前後の動画の切り取り画像

5.3 DNG 投与前後による NK 細胞の変化

次に、外部検証における時系列細胞形状特定の実験結果について述べる。外部検証として撮影された DNG 投与前後の NK 細胞群の動態解析結果を、表 5.1 および表 5.2 に示す。表 5.1 は DNG 投与前の NK 細胞の動態解析結果を、表 5.2 は DNG 投与後の NK 細胞の動態解析結果をそれぞれ示している。まず、表 5.1 と表 5.2 における面積の平均値を比較すると、DNG 投与後では投与前と比べて 100[pix] 以上増加しており、細胞が全体として肥大化している傾向が確認できた。次に周囲長について比較すると、面積の増加に伴い、周囲長も 30[pix] 以上増加していることが確認できた。一方で、円形度の平均値を比較すると、DNG 投与後では 10%以上低下した。さらに移動速度に着目すると、DNG 投与後では平均移動速度が低下しており、NK 細胞の運動性が抑制されていることが確認できた。

表 5.1 DNG 投与前の NK 細胞の動態解析結果

| 項目 | 面積 [pix] | 周囲長 [pix] | 円形度 [%] | 移動速度 [pix/frame] |
|------|----------|-----------|---------|------------------|
| 平均値 | 312.59 | 76.45 | 69.97 | 5.74 |
| 標準偏差 | 44.22 | 14.36 | 13.91 | 7.78 |
| 最大値 | 602 | 169.50 | 101.63 | 63.19 |
| 最小値 | 120 | 39.79 | 23.59 | 0.05 |
| 変動係数 | 30.14 | 18.70 | 20.47 | 135.57 |

表 5.2 DNG 投与後の NK 細胞の動態解析結果

| 項目 | 面積 [pix] | 周囲長 [pix] | 円形度 [%] | 移動速度 [pix/frame] |
|------|----------|-----------|---------|------------------|
| 平均値 | 425.99 | 106.21 | 52.45 | 3.37 |
| 標準偏差 | 148.98 | 34.18 | 17.75 | 2.59 |
| 最大値 | 896 | 202.93 | 99.34 | 17.97 |
| 最小値 | 170 | 47.79 | 21.15 | 0.05 |
| 変動係数 | 34.97 | 32.18 | 33.85 | 76.78 |

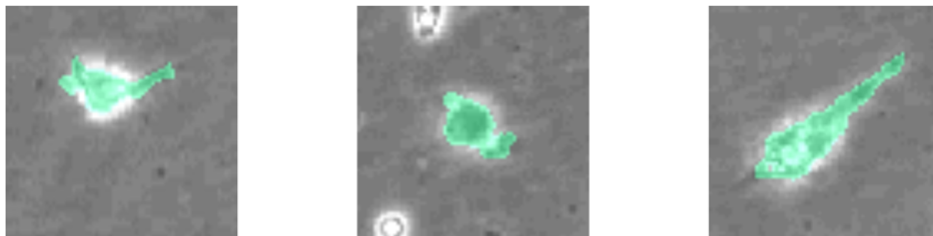
5.4 セグメンテーションアーキテクチャの測定結果

次に従来法と 5 分割交差検証の U-Net と SegNet の結果を示す。まず、従来法である輝度断面と 5 分割交差検証の U-Net と SegNet の結果は表 5.3 に示す。初めに再現率について輝度断面が $63.61\% \pm 20.42\%$ 、U-Net は $61.74\% \pm 10.54\%$ 、SegNet は $64.86\% \pm 11.06\%$ となった。セグメンテーションアーキテクチャでは、標準偏差が 10%前後になったのに対して輝度断面では 20%とばらつきが大きくなったことが確認できた。平均値はどの手法でも 60%前半の結果となった。次に適合率について輝度断面が 1 番低い 84.47% を示し、ばらつきも 27.47%とばらつきが 1 番大きくなった。しかし、セグメンテーションアーキテクチャの U-Net と SegNet についてはどちらも 95%前後の値を示し、標準偏差のばらつきも小さいことが確認できた。次に、重複率について輝度断面と U-Net の結果が 58%と低下したことが確認できた。特に U-Net についてはこれまでの実験で 80%以上の重複率が表 4.10 より確認できていたが 20%以上低下していた。また、SegNet についても他の手法より重複率が約 60%正解したが U-Net と同様に 20%以上減少したことが確認できた。

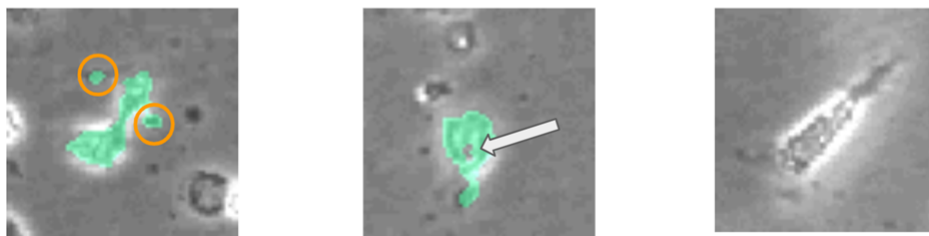
また、1 番重複率が高かった 5 分割検証の SegNet については目視での画像の確認を行った。出力画像例は下の図 5.4 に示す。図 5.4(a) ではセグメンテーションに成功した画像を示す。3つの画像を見ると NK 細胞の偽足が伸びた時でもセグメンテーションが可能であることが確認できた。しかし、図 5.4(b) ではセグメンテーションに失敗した画像を示す。図 5.4(b) での左端の画像では、NK 細胞でないオレンジ枠内に SegNet が細胞であるとセグメンテーションした結果が示されている。図 5.4(b) での中央の画像では、NK 細胞が大まかにセグメンテーションできているが白の矢印のところをみるとセグメンテーションできていないことが確認できた。最後に図 5.4(b) での右端の画像では、そもそも画像内に NK 細胞が存在しないという出力結果が確認できた。

表 5.3 外部検証結果表

| 項目 | 輝度断面 | U-Net ($K = 5$) | SegNet ($K = 5$) |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 平均 \pm 標準偏差 | 平均 \pm 標準偏差 | 平均 \pm 標準偏差 |
| 再現率 (Recall)[%] | 63.61 \pm 20.42 | 61.74 \pm 10.54 | 64.86 \pm 11.06 |
| 適合率 (Precision)[%] | 84.47 \pm 27.17 | 94.35 \pm 6.55 | 96.48 \pm 5.03 |
| 重複率 (IoU)[%] | 58.02 \pm 19.69 | 58.94 \pm 9.53 | 62.98 \pm 10.63 |
| 平均適合率 (AP)[%] | 59.52 \pm 19.06 | 60.95 \pm 8.62 | 65.12 \pm 8.83 |



(a). SegNetで成功した画像例



(b). SegNetで失敗した画像例

図 5.4 5 分割交差検証の SegNet の出力画像例

5.5 考察

最後に外部検証実験の考察を述べる．まず，DNG 投与前後による NK 細胞の変化で DNG 投与後で移動速度が減少した理由について考察する．内膜症患者の DNG 投与後の NK 細胞群は，肥大して偽足を伸ばして動くことにより，面積や周囲長の増加，円形度の減少が見られた．また，図 5.5 のように NK 細胞群が肥大化して動くことにより隣接する NK 細胞が多くなり動ける範囲が限られたため移動速度が低下したと考えられる．

次に，U-Net と SegNet のセグメンテーションアーキテクチャで重複率が 20%以上低下したことの原因について考察する．本実験では 5 分割交差検証によってモデルの汎化性能向上を図ったものの，学習データ自体が周囲の他の細胞がない状態で画像が切り取られたものが多く存在していたため，外部データに含まれる細胞集団の分布の違いに対して対応できなかった可能性が考えられる．また，外部検証データでは細胞密度，細胞形状のばらつきが学習データと異なっていたため，これがセグメンテーション精度の低下につながった可能性がある．特に，NK 細胞は形態的な個体差が大きく，境界が不明瞭な場合も多いため，学習時に十分に表現されていない形状に対しては正確な領域推定が困難となる可能性が考えられる．しかし，図 5.4(b) での左端と中央の画像についてはセグメンテーションアーキテクチャと画像処理を組み合わせることで重複率を改善できる．図 5.4(b) での左端の画像では，面積が最大の NK 細胞のみを抽出すれば重複率の低下を防ぐことが可能である．さらに，別のアプローチとして追加学習 (ファインチューニング)[28, 29] を行うことで重複率の低下を防ぐことが可能であると考えられる．追加学習により，学習済みモデルが外部検証データ特有の細胞形状や輝度分布に適応することが可能となり，境界推定の精度向上が期待される．特に，重複率は領域境界の一致度に強く依存する指標であるため，少量の外部データであっても追加学習を行うことで，予測マスクの境界位置が正解領域に近づき，重複率の改善につながる可能性が見込まれる．

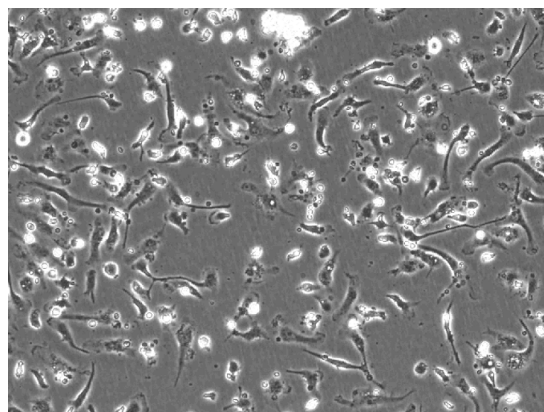


図 5.5 DNG 投与後の移動速度低下原因例

第6章 結論

本研究では、全結合層セグメンテーションアーキテクチャである FCN32s, FCN16s, FCN8s, FCN-ResNet50 およびエンコーダ・デコーダ型アーキテクチャである U-Net と SegNet を用い、内膜症および非内膜症患者由来の動画から作成された時系列データセットを使用して、K 分割交差検証により NK 細胞の時系列解析が可能であるかを検証した。その結果、いずれの分割においても、エンコーダ・デコーダ型の U-Net および SegNet が NK 細胞の形状を適切に捉え、時系列的に安定して追従できることが確認された。

さらに外部検証として、非内膜症患者に対するジエノゲスト (Dienogest : DNG) 投与前後の動画から新たにデータセットを構築し、5 分割交差検証により学習した U-Net および SegNet のセグメンテーションアーキテクチャを用いて評価を行った。その結果、外部検証において重複率が 20%以上低下することが確認された。また、DNG 投与前後における NK 細胞群の形態を比較した。その結果、平均面積および平均周囲長は増加した一方で、円形度および移動速度は低下することが確認できた。

今後の課題として、外部検証において観測された重複率の 20%以上の低下を抑制するため、セグメンテーションアーキテクチャに画像処理手法を組み合わせ、再度重複率を測定することで性能改善の有無を検証する必要があると考えられる。後処理としての画像処理の導入が、NK 細胞の輪郭抽出および追跡精度の向上に寄与するかを体系的に評価することが重要である。また、別のアプローチとして、既存のセグメンテーションアーキテクチャに対して追加学習 (ファインチューニング) を行い、重複率を指標として性能がどのように変化するかを検証する必要がある。これにより、モデルの汎化性能向上の可能性を定量的に評価できると考えられる。

さらに、内膜症患者における DNG 投与前後の NK 細胞の動態解析を実施することで、内膜症患者と非内膜症患者の間における DNG 投与前後の NK 細胞動態の比較が可能となる。このような比較解析は、疾患特異的な免疫応答の違いを解析することが可能になる。本研究により NK 細胞の時系列的な動態把握が可能となったことは、将来的な治療戦略の最適化にも貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご多忙の中数々の御指導をしてくださいました、高知工科大学 システム工学群電子・光システム工学教室 星野孝総教授に感謝の意を表し、心からお礼申し上げます。また、修士論文を執筆するにあたりご意見を頂きました、高知工科大学システム工学群電子・光システム工学教室 密山幸男教授、廖望講師に深く感謝いたします。さらに、本研究に関して日頃から様々な協力や相談を受けてくださいました、高知工科大学システム工学群 Soft Intelligent System on Chip 研究室の皆様にもこの場を借りてお礼申し上げます。最後になりましたが、大学・大学院生活 6 年間を支えてくれた家族に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1]N. Hanna and R. C. Burton, “Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 127, no. 5, pp. 1754–1758, 1981.
- [2]J. A. Sampson, “Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation,” *The American journal of pathology*, vol. 3, no. 2, p. 93, 1927.
- [3]R. Meyer, “Uber den stand der frage der adenomyositis und adenomyome im allgemeinen und insbesondere uber adenomyositis seroepithelialis und adenomyometritis sarcomatosa,” *Zentralbl Gynakol*, vol. 36, pp. 745–750, 1919.
- [4]C. Izumiya, T. Ushiwaka, T. Tsuduki, C. Yoshii, K. Taniguchi, and N. Maeda, “Decreased peritoneal NK cell movement in women with endometriosis by time-lapse imaging estimation,” *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 100, no. 118, p. 111, 2016.
- [5]M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, “Snakes: Active contour models,” *International journal of computer vision*, vol. 1, no. 4, pp. 321–331, 1988.
- [6]C. Xu and J. L. Prince, “Snakes, shapes, and gradient vector flow,” *IEEE Transactions on image processing*, vol. 7, no. 3, pp. 359–369, 1998.
- [7]B. Li and S. T. Acton, “Active contour external force using vector field convolution for image segmentation,” *IEEE transactions on image processing*, vol. 16, no. 8, pp. 2096–2106, 2007.
- [8]V. Caselles, R. Kimmel, and G. Sapiro, “Geodesic active contours,” *International journal of computer vision*, vol. 22, no. 1, pp. 61–79, 1997.
- [9]T. F. Chan and L. A. Vese, “Active contours without edges,” *IEEE Transactions on image processing*, vol. 10, no. 2, pp. 266–277, 2001.
- [10]C. Li, C. Xu, C. Gui, and M. D. Fox, “Distance regularized level set evolution and its application to image segmentation,” *IEEE transactions on image processing*, vol. 19, no. 12, pp. 3243–3254, 2010.

-
- [11] C. Li, C.-Y. Kao, J. C. Gore, and Z. Ding, “Implicit active contours driven by local binary fitting energy,” in *2007 IEEE conference on computer vision and pattern Recognition*, IEEE, 2007, pp. 1–7.
- [12] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L. Alvarez, “A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 36, no. 1, pp. 2–17, 2013.
- [13] S. Beucher and F. Meyer, “The morphological approach to segmentation: the watershed transformation,” in *Mathematical morphology in image processing*, CRC Press, 2018, pp. 433–481.
- [14] 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*, Springer, 2015, pp. 234–241.
- [15] M. J. Shannon, S. E. Eisman, A. R. Lowe, T. F. Sloan, and E. M. Mace, “cellPLATO—an unsupervised method for identifying cell behaviour in heterogeneous cell trajectory data,” *Journal of Cell Science*, vol. 137, no. 20, jcs261887, 2024.
- [16] A. Maiorana et al., “Evaluation of long-term efficacy and safety of dienogest in patients with chronic cyclic pelvic pain associated with endometriosis,” *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 309, no. 2, pp. 589–597, 2024.
- [17] 陳東克彦 and 桜井智宏, “粒子形状測定技術,” *日本画像学会誌*, vol. 46, no. 6, pp. 465–471, 2007.
- [18] V. Badrinarayanan, A. Kendall, and R. Cipolla, “Segnet: A deep convolutional encoder-decoder architecture for image segmentation,” *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, vol. 39, no. 12, pp. 2481–2495, 2017.
- [19] J. Long, E. Shelhamer, and T. Darrell, “Fully convolutional networks for semantic segmentation,” in *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 2015, pp. 3431–3440.
- [20] K. He, X. Zhang, S. Ren, and J. Sun, “Deep residual learning for image recognition,” in *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 2016, pp. 770–778.
- [21] W. Xing et al., “CM-SegNet: A deep learning-based automatic segmentation approach for medical images by combining convolution and multilayer perceptron,” *Computers in Biology and Medicine*, vol. 147, p. 105797, 2022.
- [22] R. Kohavi et al., “A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection,” in *Ijcai*, Montreal, Canada, vol. 14, 1995, pp. 1137–1145.

- [23] M. Stone, “Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions,” *Journal of the royal statistical society: Series B (Methodological)*, vol. 36, no. 2, pp. 111–133, 1974.
- [24] G. Bertasius, J. Shi, and L. Torresani, “Semantic segmentation with boundary neural fields,” in *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 2016, pp. 3602–3610.
- [25] 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*, 2014, pp. 580–587.
- [26] F. E. Harrell Jr, “Multivariable modeling strategies,” in *Regression modeling strategies: With applications to linear models, logistic and ordinal regression, and survival analysis*, Springer, 2015, pp. 63–102.
- [27] T. D. Cook, D. T. Campbell, and W. Shadish, *Experimental and quasi-experimental designs for generalized causal inference*. Houghton Mifflin Boston, MA, 2002, vol. 1195.
- [28] D. Karimi, S. K. Warfield, and A. Gholipour, “Transfer learning in medical image segmentation: New insights from analysis of the dynamics of model parameters and learned representations,” *Artificial intelligence in medicine*, vol. 116, p. 102 078, 2021.
- [29] R. Wang, T. Lei, R. Cui, B. Zhang, H. Meng, and A. K. Nandi, “Medical image segmentation using deep learning: A survey,” *IET image processing*, vol. 16, no. 5, pp. 1243–1267, 2022.