

網膜細胞画像認識システムの
構築とその応用による
網膜細胞形態解析に関する研究

横山 清子



網膜細胞画像認識システムの
構築とその応用による
網膜細胞形態解析に関する研究

横山 清子

目 次

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第1章 緒 論 | 1 |
| 1. 1 本研究の目的 1 | |
| 1. 2 関連する従来の研究と本研究の位置づけ 3 | |
| 1. 3 本論文の構成 5 | |
| 第2章 網膜細胞画像認識システムの構築 | 9 |
| 2. 1 はしがき 9 | |
| 2. 2 網膜細胞画像認識システムの概要 10 | |
| 2. 2. 1 システムの設計目的 10 | |
| 2. 2. 2 システムの特長 10 | |
| 2. 2. 3 ハードウェア構成 11 | |
| 2. 2. 4 システムのファイル構成 11 | |
| 2. 3 網膜細胞画像認識システムの機能 11 | |
| 2. 3. 1 画像入力 12 | |
| 2. 3. 2 特徴抽出 14 | |
| 2. 3. 3 統計解析 14 | |
| 2. 3. 4 画像出力 17 | |
| 2. 4 網膜細胞画像認識システムの運用例とシステム評価 17 | |
| 2. 5 網膜細胞画像認識システムに関する考察 24 | |
| 2. 6 むすび 26 | |
| 第3章 画像処理による細胞像データの収集と保存およびデータ圧縮 | 27 |
| 3. 1 はしがき 27 | |
| 3. 2 細胞像データ抽出のための画像処理による前処理 28 | |
| 3. 2. 1 濃淡画像におけるノイズ除去方法 28 | |
| 3. 2. 2 細胞像データ抽出のためのエッジ強調法 30 | |
| 3. 2. 3 画像処理による顕微鏡画像の焦点ずれの補正 32 | |
| 3. 3 細胞像の抽出方法 32 | |
| 3. 4 細胞像からの細胞体と主樹状突起の分離法 34 | |
| 3. 5 細胞像保存を目的とした2値画像の記述方法 35 | |

| | | |
|---------|-------------------------------|----|
| 3. 5. 1 | ビットパターン法 | 35 |
| 3. 5. 2 | ランレングス法 | 36 |
| 3. 6 | 細胞像保存を目的とした輪郭線の記述方法 | 37 |
| 3. 6. 1 | チェインコード法 | 37 |
| 3. 6. 2 | 輪郭線の極座標表示 | 37 |
| 3. 6. 3 | 細胞画像の輪郭線の2次元データ系列による表現 | 38 |
| 3. 6. 4 | 輪郭線データの代数的関係による特徴づけ | 39 |
| 3. 7 | データ圧縮を目的とした輪郭線近似法による細胞像形態の記述 | 41 |
| 3. 7. 1 | 輪郭線近似のアルゴリズム | 41 |
| 3. 7. 2 | 3近似手法によるシミュレーション図形と細胞像形態の近似例 | 44 |
| 3. 7. 3 | 細胞画像とその近似図形の特徴量の比較 | 46 |
| 3. 7. 4 | 近似図形の形態分類への応用に関する検討 | 47 |
| 3. 8 | むすび | 51 |
| 第4章 | 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法 | 54 |
| 4. 1 | はしがき | 54 |
| 4. 2 | 樹状突起認識のための図形の細線化手法 | 55 |
| 4. 3 | 従来の細線化手法と提案手法との比較 | 55 |
| 4. 3. 1 | 従来より提案されている細線化のアルゴリズム | 55 |
| 4. 3. 2 | シミュレーション図形を用いた各手法の評価 | 61 |
| 4. 3. 3 | 網膜細胞画像を用いた従来法との比較検討 | 62 |
| 4. 4 | 樹状突起認識精度向上のための細線化の前処理 | 63 |
| 4. 4. 1 | 輪郭線の変動に伴うアーチファクトの平滑化 | 63 |
| 4. 4. 2 | シミュレーションによる平滑化手法の検討 | 64 |
| 4. 4. 3 | 網膜細胞画像を用いた前処理の効果の評価 | 66 |
| 4. 5 | むすび | 69 |
| 第5章 | 網膜細胞画像の形態に関する特徴抽出 | 71 |
| 5. 1 | はしがき | 71 |
| 5. 2 | 画像処理による細胞体形態の特徴抽出 | 72 |
| 5. 2. 1 | 細胞体の2値画像の特徴量 | 72 |
| 5. 2. 2 | 細胞体の系列データ表現における特徴量 | 72 |
| 5. 2. 3 | ナマズ網膜の神経節細胞における細胞体形態に関する特徴抽出例 | 73 |
| 5. 3 | 網膜細胞の樹状突起形状の特徴抽出 | 74 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5. 3. 1 | 網膜細胞の樹状突起形状の特徴量 | 74 |
| 5. 3. 2 | 樹状突起の形状による細胞像の形態に関する特徴抽出例 | 78 |
| 5. 4 | 細胞形態の分類法 | 85 |
| 5. 4. 1 | 形態の類似度の定義 | 85 |
| 5. 4. 2 | テンプレートマッチング法 | 87 |
| 5. 4. 3 | クラスタリング法 | 90 |
| 5. 5 | 多変量解析による細胞形態解析 | 94 |
| 5. 5. 1 | 主成分分析法 | 94 |
| 5. 5. 2 | 判別分析法 | 96 |
| 5. 6 | むすび | 99 |
| 第6章 | 細胞画像認識システムによる網膜細胞形態の成長過程および 異種生物間の比較 | 100 |
| 6. 1 | はしがき | 100 |
| 6. 2 | 解析内容 | 101 |
| 6. 3 | 解析結果 | 101 |
| 6. 4 | 考察 | 106 |
| 6. 5 | むすび | 109 |
| 第7章 | 細胞画像認識システムによるナマズ網膜細胞の光刺激反応 | 110 |
| 7. 1 | はしがき | 110 |
| 7. 2 | 光刺激反応実験 | 111 |
| 7. 3 | 頻度分布パターンの特徴抽出 | 111 |
| 7. 3. 1 | インパルス頻度分布の入力 | 111 |
| 7. 3. 2 | ピークの検出 | 111 |
| 7. 3. 3 | ピークの形状に関する特徴量 | 113 |
| 7. 4 | 解析結果と考察 | 113 |
| 7. 5 | むすび | 120 |
| 第8章 | 総 括 | 122 |
| 謝 辞 | | 124 |
| 参考文献 | | 125 |
| 研究業績 | | 135 |

第1章 緒 論

1. 1 本研究の目的

生物学の分野においては、網膜細胞の機能と形態の解析は従来から重要な研究テーマである。研究対象に網膜細胞が着目される理由は、体表に現われた唯一の神経細胞であること、および、網膜のみで刺激の受容、情報処理を行い、脳への反応伝達を行うことなどが確かめられているためである。すなわち、網膜は「体表に現われている脳の一部」ということができる。従って、網膜の研究は、視覚のメカニズムを解き明かすのみでなく、脳の機能の解明の一助を担うといえる。視覚のメカニズムを解明することにより、医学的には視覚障害の治療に応用できる。また、工学的には、パターン認識、コンピュータグラフィックスの分野に応用できる。さらに、脳の機能が解明され、思考のメカニズムが明らかになれば、ニューロコンピュータ、人工知能など幅広い応用が期待される。

網膜の機能の解析に関しては、光刺激や電気刺激を与えて反応する細胞に電極を挿入して、その反応インパルスを抽出することにより刺激の伝達経路を求めたり、モデルの推定を行ったり、各細胞がいかなる刺激に反応し、いかなる反応を示すか等を実験により求める方法がとられている。これらは、直接機能を明確にするが、電極を挿入する持続時間の限界、多数の神経細胞から同時に刺激を取り出すことの困難さ、電極を挿入することによる神経細胞に及ぼす影響などの理由により必ずしも体系的に、また、統計的に解析を行うことは容易ではない。

一方、形態解析は、機能解析における電気生理の実験に比較して、多数の細胞像を体系的に扱うことが容易である。例えば、一つの部位の細胞を多数個同時に解析することが可能であり、また、樹状突起等の連結関係を追跡すれば網膜内の神経細胞のネットワーク関係を明確にすることができる。

従来までの計算機による神経細胞像の形態解析は、樹状突起の枝分かれパターンの解析、細胞像の3次元像再構成等、一つの像を詳細かつ正確に記述する試みに力が注がれてきた。これには一つの細胞の記述にあたり、多くの記憶容量と計算時間が必要で、そのため、画像データベースのように多数の細胞像を用いた検索等の処理には、これらの記述方法は、あまり効果的でない。

元来、生物学の分野においては、実験で算出される数値データや画像データは数多く膨大であるが、これらのデータの管理や画像の認識に計算機を用いているところは少なく、画像の認識を目的とするシステムや研究支援用データベース提案の試みはきわめて稀である。従来は、記録紙に記述した実験データや、顕微鏡画像の写真、スケッチ画等を、研究者が整理、保存し、経験に基づき解析、検討を加えてきた。従って、これら多量のデータを保存、管理でき、さら

に統計処理、検索や画像認識などをデータベース化して形態解析を行えば、従来と異なり巨視的に神経細胞の形態を明らかにすることができる。この形態解析の結果と機能に関する解析結果を統合できれば、多数の細胞がお互いに関連しあっている網膜に関し、視覚システムとしてのメカニズムをより詳細に解明することができる。また、機能の解析に関しては、多数の個体を対象とした統計解析が容易に行え、種としての網膜の特徴付け、異種生物や生物の成長に伴う比較結果も得られると考えられる。そこで、本研究においては、主にナマズの網膜の神経節細胞の形態解析を目的とした細胞画像認識システムの構築とそれを応用した解析について検討を加えた。

研究対象は、ナマズ等の神経節細胞の2次元画像である。ナマズを対象とした理由は、以下の3点である。

- (1) 従来の研究で網膜の神経節細胞から脳への連結関係のモデルが明確にされている。
- (2) 構造が比較的単純である。
- (3) 電気生理等機能に関する解析が多数行われている。

また、神経節細胞について解析を行った理由は、網膜内では軸索を持つ唯一の細胞で、脳との連結関係を持つ細胞である。網膜内で受容細胞が光を受容し、水平細胞、双極細胞、アマクリン等で情報処理された信号が最終的に神経節細胞に伝達され、さらに情報処理し脳への信号伝達を行うと考えられる。従って、神経節細胞が最も複雑な機能を持ち、かつ脳の神経細胞に機能面で最も類似していると考えられるからである。

さらに、2次元画像として解析を行った理由は次のとおりである。すなわち、網膜は、R.Y. Cajal が提案した⁽¹⁾ように層構造をなしている。網膜の構造を解析するためには、網膜を上から眺める top view と横から眺める side view によるものがある。side view は層構造を解析したり、層の連結関係を解析する手段に用いる。1つの層のみに着目して解析する場合は、top view が適切である。本研究において対象とする神経節細胞は、網膜の最も内側の層に存在し、細胞体や樹状突起が水平方向に広がっている。これは形態解析において、光学顕微鏡像を対象に行ったが、焦点深度をわずかながら変化させても形態に変化はなかったことから判断できる。さらに、解析は一つの層における1つの細胞の細胞体像や主樹状突起の本数等の特徴量を対象に行った。これらの理由から、top view の投影像である2次元画像による解析で十分であると考えられる。

以上の各理由により、本研究ではナマズの網膜の神経節細胞の形態解析を目的とした細胞画像認識システムの構築を行った。このシステムにおいては、染色した網膜の神経節細胞の光学顕微鏡像を対象とし、画像処理の手法を用いて細胞像を抽出し、形態に関する特徴量の計算を行った。抽出した細胞像に関しては、データ圧縮を行い、形態の特徴量とともに画像データベースに保存した。画像データベースに保存されたデータに対し、統計解析、多変量解析などの手法を適用し各種の解析を行った。

目的とした解析内容は、以下の4点である。

- (1) ナマズ網膜神経節細胞の形態分類
- (2) 生物の成長過程、異種生物間における形態比較
- (3) 注入酵素と抗体反応を示す細胞形態の特徴付け
- (4) 光刺激に対する反応の変化の解析

本研究のように形態を組織的に解析する試みは、網膜の機能を明確にするためにも意義あることといえる。

1. 2 関連する従来の研究と本研究の位置づけ

網膜細胞に関する研究の概略、計算機形態学の流れを簡単に述べ、本研究の位置づけを行う。

網膜細胞の機能に関する解析は、主に網膜に光、電気刺激を与え、その出力を特定の神経細胞に電極を挿入して抽出することにより行う。研究例としては、空間周波数や変調周波数を変化させた光刺激を網膜に照射してその応答特性の相違から、X、Y、W-cell と分類したもの^{(2),(3),(4),(5),(6)}、刺激の相違により反応する細胞の種類、応答開始時間、反応継続時間の変化を解析したもの^{(7),(8),(9),(10)}、入力に白色雑音光を用いて、神経節細胞、アマクリン細胞から出力信号を抽出し、神経節細胞間、あるいは神経節細胞とアマクリン細胞の間の伝達関数を推定するもの^{(11),(12),(13),(14)}等がある。

機能のみでなく形態と機能とを関連付ける試みもなされている。解析例としては、形態に関するグループ分けを行い、形態の変化に関して刺激に対する応答動作の相違を解析するものがある^{(15),(16),(17),(18)}。これは、神経節細胞の樹状突起の形状から、 α 、 β 、 γ -cell に分類し、それと刺激に対する反応動作の相違から分類されたX、Y、W-cell とを対応付けるものなどである。次に、電気生理の実験により刺激に対する応答動作を解析しておき、その動作が既知の細胞に関する形態解析を行うものがある^{(19),(20),(21),(22),(23),(24),(25)}。これは、X、Y、W-cell 各々に関する形態解析、あるいは、応答動作が異なる細胞のシナプス形状、視神経繊維の相違等を解析するものである。その外、神経伝達物質を有する細胞を特定酵素との抗体反応により抽出して、その形態解析を行うもの等もある^{(26),(27),(28),(29)}。

次に、形態解析であるが、網膜を含む神経細胞の形態の組織的な記述は、前世紀末から今世紀初頭 R.Y.Cajal により始められた⁽¹⁾。彼は、網膜細胞をその側面像から受容器、双極細胞、水平細胞、神経節細胞、アマクリンの5つの型に分類した。彼の多数の細胞を対象とした直観による分類は古典的形態学として現在まで続いている。神経細胞の構造を、その細胞の存在位置から特徴付けたり、その構造を体系化する試みは、Richardson, Stell, Boycott らにより行われた^{(30),(31)}。また、R.Moliner は、細胞の樹状突起の形態で分類、あるいは、特徴付けを行った^{(32),(33)}。形態を定量データの測定によって特徴付ける試みは、Palkovits のネコの脳の細胞数、分布の測定等がある⁽³⁴⁾。また、Bok,Sholl らは、神経の形態を数学的法則で記述する定

量解析を行った^{(35),(36),(37)}。計算機を使用しない神経細胞の定量解析は、それを顕微鏡で観察しながら、グラフ用紙等にトレースしたり、トレースした輪郭線を切り出し、立体的に積み上げて測定した。そのため、多くのデータを扱うことは困難であり、また正確さにも欠けていた。

1970年頃になり、計算機の普及にともない、神経細胞の形態解析にも計算機が用いられるようになった。それらは大約次の4種類の研究に分類できる。

第1は、細胞像を計算機に取り込み、その簡単な数値データの抽出、表示を、自動あるいは、半自動で行うシステム構成である。これは、Wann, Lindsay, Glasser, Punnett, Boyle, Capowskiらにより行われた^{(38),(39),(40)}。測定される定量データは、例えば樹状突起の太さ、長さ、細胞体の面積等である。

第2は、計算機内での細胞の3次元像再構成である。これは、電子顕微鏡像を用いた、Crowther, Reddy, 2次元切片画像より3次元像再構成を行った Weinstein, Eliasらの研究がある^{(41),(42),(43)}。これらは、ライトペン等で、各切片ごとの輪郭線を追跡して、計算機に入力し、計算機内では、別々の記憶領域（ページ）に記憶する。そして、そのページを重ねることにより、計算機内で3次元像を再生する。すなわち、従来までは、紙に輪郭線を描き、それを切り取り積み上げて立体像を作っていたものを、計算機で実行させる試みである。また、3次元像の表示に関しては、隠線消去等の問題点がある。

第3は、樹状突起の枝分かれパターンを計算機で解析する試みである。これは、Capowski, Fox, Barnard, Cavanaghらが行った⁽⁴⁴⁾。枝分かれパターンの記述に関しては、細胞像を操作者が見ながら、その枝分かれ点を示し、その座標値を計算機に入力する。そして、計算機内ではそれをスケルトン表示し、枝分かれの数、枝の長さ等の測定を行う。

第4に、計算機を用い、形態の特徴量を抽出し、形態分類、統計解析を行う例である。形態分類に関しては、Shantzeによるカエルの網膜細胞の3次元の構造解析に基づく形態分類⁽⁴⁵⁾、Hitchcockらによるキンギョの網膜の神経節細胞の樹状突起のパターンに基づく形態分類⁽⁴⁶⁾、Dunn-meynellらによるナマズの網膜の神経節細胞の、細胞体、樹状突起の形状と樹状突起の分布の深さに基づく分類⁽⁴⁷⁾、ネコ、ネズミ等の神経節細胞の細胞体の面積、樹状突起の太さ等に基づく分類⁽⁴⁸⁾等が報告されている。

形態に関する統計解析の例としては、Frankらによるカエルを対象とした細胞体の大きさ、位置、樹状突起の形状と細胞体形態の関連⁽⁴⁹⁾、Petersonらによるカメを対象とした細胞体の大きさに関する統計解析⁽⁵⁰⁾、Oysterによるウサギの網膜の神経節細胞を対象とした細胞体の面積に関する統計解析^{(51),(52)}などがある。これらの研究に関して、計算機を用いデータベース化し、形態分類、統計解析、多変量解析までを総合して行っている例はみない。

一方、画像データベースの研究に関しては、手書き文字⁽⁵³⁾や、X線写真等の医用画像^{(54),(55)}、指紋写真⁽⁵⁶⁾、考古学データ⁽⁵⁷⁾、タンパク質⁽⁵⁸⁾、等数多くの応用例がある。本研究は、画像データベースの応用の例を見ない生物学の神経形態学分野に画像データベースの適用を行った

ものである。画像処理の技術を適用することにより、画像データベースにおけるデータ入力の困難さを解決し、自動で画像入力、特徴抽出を行えるようにした。さらに、形態解析に関しても形態分類、統計解析、多変量解析の手法を総合的に応用することを可能にした。このシステムを応用し、ナマズの網膜の神経節細胞の形態分類、生物の成長過程や異種生物の形態比較、酵素反応細胞の形態解析に適用し、従来関心が持たれてきた神経細胞の形態解析のテーマ、および、形態と機能の関連の解析のテーマへの応用に関して検討することができた。さらに、光刺激に対する反応インパルス頻度ヒストグラムの解析にも本研究で構築した細胞画像認識システムを応用し神経細胞の機能に関する解析への応用の可能性も示唆できた。

1. 3 本論文の構成

本研究を進めるに当たっての基本方針と手法について述べる。

- (1) 生物学の研究者が容易にシステムを扱うことを考慮し、対話型処理を基本とし、画像から得られた形態に関する特徴量のみでなく、機能に関する解析も可能とする設計方針に従った画像データベースの構築。
- (2) 多数の細胞像の形態を統計的に解析するため、2次元画像から画像処理で客観的に容易に抽出できる特徴量を用いた解析を対象とした。従って、特徴量の計算方法や各特徴量を用いた解析結果に関する検討を行なう。
- (3) 多数の細胞画像を計算機へ入力するため、光学顕微鏡の濃淡画像を画像処理して、半自動で細胞像抽出、保存を行なう。濃淡画像を2値化し、細胞像を抽出するための閾値化の手法とその前処理の効果の検討を行なう。
- (4) 多数の細胞画像を保存しておくためのデータ圧縮を行なう。2値画像を保存するためのコード化法の検討と、形態を簡単化するための輪郭線近似手法の検討および輪郭線近似の妥当性の評価。
- (5) 細胞の樹状突起に関する形態解析を行なうための、細線化手法を用いた樹状突起の骨格線化の検討と樹状突起の形状パターンの特徴抽出法およびその特徴量を用いた形状解析例。
- (6) 特徴量を用いた統計解析、形態分類、多変量解析の手法の検討とナマズ網膜の神経節細胞を用いた解析結果に関する考察。
- (7) 画像認識システムを用いた形態解析の例として、ナマズ、カエル及びオタマジャクシの神経節細胞を対象とした解析結果の考察。
- (8) 画像認識システムを用いた機能の解析例としてナマズ網膜に各種の光刺激を照射したときの反応インパルス頻度分布の解析結果の考察。

以上の方針に基づき本研究では、1. 1, 1. 2で述べたように従来検討されなかった多数の細胞像を対象とした形態と機能の解析を計算機を用いて行なう手段の検討と数々の応用の可能性を立証することができた。

以下に本論文の各章の概要を述べる。

第2章では、細胞画像認識システムの設計目的、機能、特徴、ハードウェア構成、機能に関する概要について述べる。さらに、運用例としてシステムのメニュー例、簡単な解析結果の表示例を示す。そして、システムにおける計算時間、データの記述容量等システム評価の結果を示す。

第3章では、細胞画像認識システムへのデータ入力、保存に関する検討結果について述べる。

まず、網膜細胞の光学顕微鏡像から、画像処理の手法で細胞像と細胞体像の抽出、保存を行なう手法を提案する。内容は、標本化した細胞の濃淡画像を対象とした、ノイズ除去、エッジ強調、ボケ除去等の前処理法と、細胞画像抽出のための画面の2値化法の検討を行なう。次に、細胞体と主樹状突起を自動で分離するための方法の提案を行なう。

多数の細胞像をデータ圧縮し保存するために、まず抽出した細胞像、細胞体像の2値画像のコード化法を検討し、輪郭線のチェーンコード法による記述が有効であることを確かめた。次に、細胞体画像を1次元および2次元の系列で表現する方法とその代数的特徴付けを行ない形態の特徴抽出を行なうことの妥当性を検討する。最後に、輪郭線近似図形を用いた細胞体画像の記述に関する検討を行なった。近似手法は、多角形近似法である最大多角形法と最小2乗法、曲線近似であるフーリエ記述子による近似手法を、そのデータ圧縮率、原画像の特徴量の保存という観点で比較検討を行なう。その結果、細胞体像の記述にはフーリエ記述子による近似手法が最も適していた。

第4章では、細胞画像の樹状突起の形状解析のための細線化手法を用いた樹状突起認識法の検討を行なう。神経細胞の樹状突起は、細胞間、細胞と脳との間の生体信号の伝達に関与している。樹状突起の連結関係の認識は、感覚器官と脳との間の生体信号の伝達経路の推測に有効であるし、広がり大きさや樹状突起の本数により細胞の機能、情報処理量の推測が可能となる。従って、樹状突起の形状解析は、細胞の形態と機能の関連の解析を可能とし、生物学の分野において従来より関心がもたれたテーマである。

樹状突起は、ふくらみのある細胞体より細長く伸びているので、この形状を計算機で自動認識するため、細胞像を細線化し、樹状突起の骨格線を抽出し、それを用いて形態解析を行なった。細線化手法は、従来手書き文字等を対象として提案された手法を細胞像のように輪郭線がなめらかでない画像に適用できるように改良した手法を提案する。提案手法に関しては、シミュレーション図形と、細胞体と主樹状突起を持つナマズの神経節細胞像とを対象とし、従来法と比較、検討を行ない、計算時間、認識結果ともに提案手法が優れていることを確かめる。

次に、この細線化手法のみでは、認識結果において不十分であったため、2値画像を対象に輪郭線を平滑化する手法を提案する。さらに、シミュレーション図形を用いて、最適な前処理の手法の選択法を提案した。最適な前処理を行ない、その効果を細胞像を用いて評価した結果97%の認識率で樹状突起の骨格線を抽出することができた。

第5章では、細胞画像認識システムにおける網膜細胞画像の形態に関する特徴抽出を述べる。まず、本システムで計算可能な細胞体形態の特徴量に関して、画像処理により2次元画像から計算する方法と、系列データ表現における特徴量の計算方法とについて述べる。ナマズの神経節細胞を対象に、これらの特徴量を求め簡単な統計解析を行なった例も併せて述べる。

また、網膜細胞の樹状突起形状に関する特徴量について述べる。特徴量は、樹状突起の骨格線より計算する。求めた特徴量を用いて簡単な統計解析を行なった例と樹状突起の分岐パターンを計算機で自動認識した例を示す。

次に、特徴量を用いた形態解析手法として形態分類の手法について述べる。形態の類似度を定義し、基準となる形態と類似したものを抽出するテンプレートマッチング法、および特徴量空間内で類似したものから順にまとめていくクラスタリング法について述べる。これらの手法を用いた形態分類の結果例も併せて示す。

最後に、特徴量を用いた形態解析手法として多変量解析の手法について述べる。多変量解析としては、複数の特徴量を少数個の主成分に要約する主成分分析法と、既存のグループに対し新しい細胞がいずれのグループに含まれるかを判定する判別分析法について述べた。主成分分析の結果、特徴量の数を少なくし、1つの細胞を記述することの有効性を表わす例と、判別分析に関しては抗体反応の結果でグループ分けされた細胞群と神経節細胞との比較の例を示す。

以上から、大量の細胞画像を対象とした客観的な形態解析に適する特徴量である形態を巨視的にとらえ、画像処理で自動抽出可能な特徴量を求めることが可能となった。また、細胞画像認識システムを用い細胞形態解析を行なう時用いる形態分類、多変量解析手法について検討し、形態解析への応用の可能性を示唆することができた。

第6章では、細胞画像認識システムによる形態解析の一例として、ナマズ、カエル、オタマジャクシの神経節細胞の形態解析の結果を示す。

異種生物の間での細胞形態の比較、生物の成長過程にともなう細胞形態の比較は、従来より生物学の分野において関心が持たれてきたテーマである。本研究における形態比較の結果、ナマズ、カエル、オタマジャクシの細胞体形態の特徴量を比較すると、ナマズとオタマジャクシの特徴量の分布形状が類似していた。カエルとオタマジャクシの神経節細胞の比較においては、大きさに関する特徴量はカエルが大きく分布の範囲も広がった。しかし、細長さ等形状や樹状突起の本数に関しては、カエルの方が分布のばらつきが小さく類似した形状のものが多かった。カエルとオタマジャクシの形態比較により、大きさに関する特徴量の値は成長と共に大きくなるが、細長さ、樹状突起の本数の分布には大きな差異はみられなかった。

第7章は、細胞画像認識システムの統計解析部分を利用して、ナマズの網膜に光刺激を照射した際の反応インパルス頻度分布を解析した結果について述べる。網膜細胞の機能を解析する試みは、従来より多数行なわれている。その一例として光刺激を照射した際の網膜細胞の反応動作を解析する試みがある。本研究では、設計した細胞画像認識システムにより各種の光刺激

第1章 緒 論

に対し、神経節細胞に挿入した電極より抽出した反応インパルスの頻度分布の形状を画像としてとらえ、その特徴量を抽出し、抽出した特徴量を同システムの統計解析部分を利用して解析を行なった。その結果、光の位置の移動と明るさの変化という2種類の刺激を比較すると、光の位置の移動は刺激が強いためか反応に関する個体差が少ないこと、網膜に照射される光の量は神経節細胞の反応の強さに関係し、光の網膜細胞への照射時間は反応時間に比例していること等が推測された。

第8章は本研究のまとめとして、設計した細胞画像認識システムの生物学の分野における細胞形態解析に関する研究への応用の可能性に対する展望を述べる。また、本研究を基礎として、さらにこの研究を発展させる方向について述べる。

第2章 網膜細胞画像認識システムの構築

2.1 はしがき

最近の計算機技術の向上とデータベース理論の研究に伴い^{(59),(60),(61),(62),(63)}、各種の分野でデータベースシステムが設計、運用されている^{(64),(65),(66)}。特に、画像処理、パターン認識技術とデータベース理論を組み合わせることにより、手書き文字認識システム⁽⁵³⁾、医用画像データベース^{(54),(55)}、指紋の照合システム⁽⁵⁶⁾、考古学データ管理システム⁽⁵⁷⁾等画像データを保存し、画像検索、認識等を行うシステムが開発され、有効に利用され、研究、臨床応用、犯罪捜査等への一助を担っている。

生物学の分野においては、実験で算出される数値データ、画像データ等は数多く膨大であるが、これらのデータの管理、分析や画像の認識等に計算機を用いているところは少なく、特に画像の認識を目的とするシステムや研究支援用データベース提案の試み⁽⁵⁸⁾はきわめて稀である。従来までは、記録紙に記述した実験データや、顕微鏡画像の写真、スケッチ画等を、研究者が整理、保存し、経験に基づき解析、検討を加えてきた。従って、これら多量のデータを保存、管理でき、さらに統計処理、検索や画像認識が容易に行えるシステムが構築できれば、系統的な研究を進めることができ、生物学の各種の研究において、有用な研究環境を提供できると考えられる。また、生物学の分野における画像認識に関わるデータベースシステムが実現できれば、細胞の形態と機能の関連の解析^{(67),(68)}、異種生物間における細胞形態、あるいは刺激に対する反応動作の変化の解析⁽⁶⁹⁾、生物の成長に伴う細胞形態の変化⁽⁷⁰⁾等の従来から関心がもたれてきている各々の研究にきわめて有用であるとともに、相互の研究関連にも重要な役割を果たすことが期待される。

本章では、本研究の主たるテーマであるナマズの網膜細胞の形態解析について客観的かつ体系的に行うことを目的とした網膜細胞画像認識システムの構成、特徴、機能に関する概要⁽⁷¹⁾を述べる。画像データベースシステムを用いて細胞の形態と機能の解析を行うことにより、従来までは、主観的判断に基づいてしか行われなかった形態に関するグループ分け、他生物の細胞形態との比較、さらには、機能と形態の関連の解析などが可能となる。本システムにおいては、ナマズの網膜細胞の光学顕微鏡像を対象として、形態の特徴量を計算、保存し、検索、分類を行うことができる。さらに、ヒストグラムやスカッタダイアグラムの表示、各種統計量の算出を可能とした。

システム設計上考慮した点は次のとおりである。

- (1) 操作性を向上させるため画面に表示されるメニューに従い処理を進めるようにした。
- (2) データ入力に関しては、計算機で算出可能なデータは、計算後、自動的にデータベースに

入力することを可能とした。

- (3) 細胞形態に関する特徴量は、画像処理により自動抽出した。
- (4) データベースは、扱うデータの汎用性を考慮した設計であるため細胞の光刺激反応に関する実験時系列データに関する解析等細胞の機能に関する解析も可能とした。
- (5) 細胞画像データの圧縮や特徴量計算における計算時間の短縮を目的として、細胞体の輪郭線の座標の一次元系列、細胞体像の近似図形⁽⁷²⁾、あるいは細胞像の骨格線画像を用いて各種の特徴量が表現できるようにした。
- (6) システムの拡張性を考慮して、データの計算方法や、統計解析の方法を容易に追加、変更できるようにしたことなどである。

本章では、2.2でシステムの設計目的、機能、特徴を、2.3でシステムの構成、2.4でこのシステムを用いた処理例について述べる。また、2.5でシステムに関する考察を行う。なお、本章は本研究における概要について述べたもので、第3章以下の各章節は本章における各項目の具体的事項に関して解析、検討を加えたものである。

2.2 網膜細胞画像認識システムの概要

2.2.1 システムの設計目的

以下に、網膜細胞の形態解析で意図する内容とそれを実現するために付加した細胞画像認識システムの機能について特徴的な部分を述べる。

- (1) 大量の画像データを保存し、細胞画像のグループ分けに適したパラメータを抽出し、形態分類を行う。従って、細胞画像を簡単な手順で計算機に取り込み、画像処理により、細胞像データの抽出、保存ができる。
- (2) 任意の網膜細胞に対する分類、形態解析に有用な手法や、使用する特徴量は確立していないので、画像あるいは、その近似図形に関して、各種の特徴量を計算できるようにし、また、それらの追加、変更を容易にした。
- (3) 細胞形態を種、生物間で定量的に比較できるように、各種の統計解析、特徴量空間における距離尺度を用いた分類、多変量解析などを可能とした。
- (4) 検索、分類結果を画像あるいは、ヒストグラム、スキャタダイアグラム、樹形図等各種グラフで表示できる。

2.2.2 システムの特長

システムの特長は以下の通りである。

- (1) 処理内容をメニュー形式で記述している。従って、操作が簡略である。また、処理に有効な特徴量、手法が明確でない場合でも、メニューの中から適当な手法、特徴量を選択し、そ

の処理結果を参照し、より適切な手法等の抽出を可能とした。

- (2) 解析に用いるデータは、画像処理で画像から計算して入力するだけでなく、キーボード入力も、プログラムからの計算結果も使用できる。従って、細胞形態に関する特徴以外のパラメータを用いた解析を可能とした。
- (3) 画像データのデータ圧縮の手法を各種使用可能としている。大量の細胞画像データの解析を目的としているため、可能な限り少ないデータ量で、かつ形態の特徴を失わないデータ保存を行う。
- (4) 新しい機能の追加、変更が容易な設計。

2. 2. 3 ハードウェア構成

本システムのハードウェア構成を図2-1に示す。CPUは、DEC社製VAX11/780を用いている。顕微鏡画像の入力には、Spacial Data社製ビデオディジタイザOSCON IIを用いた。ビデオディジタイザは解像度640×480ドット、濃淡レベルは8bitである。画像データやプログラム等の保存には、456MB磁気ディスクパック装置を、また、解析結果の図形表示には、TEKTRONIX社製蓄積型ディスプレイTEK-4014、TEK-4010と、そのハードコピー装置を用いた。この画像認識システムは、DEC社提供のOSであるVMS(Ver.4.3)上で、FORTRANで記述・運用している。

2. 2. 4 システムのファイル構成

画像認識システムは、画像解析、パターン認識、統計解析および画像や特徴パラメータ等の数値データを管理するソフトウェア群と、細胞画像データ及び細胞像の形態の特徴を表現する数値データが記述されたテーブルより構成される。これらのソフトウェアは、一つのメインメニューよりすべて選択実行可能である。この機能に関しては、2.3で概説する。データに関しては、システムのファイル構成図を図2-2に示す。まず画像は、細胞像と細胞体画像の二値画像データが存在する。さらに、近似法を用い簡単化した画像や、骨格線画像をデータとして保存することもできる。これらは、形態の特徴量計算時に参照し、細胞の識別名をキーとして、分類結果や細胞像の表示において利用する。細胞像形態の特徴量および細胞に関する属性は、細胞の識別を行う項目番号と複数個の特徴量の値が記述されたテーブルに保存される。これ以外に、項目番号と細胞の識別名を持つテーブルが存在し、この項目番号で特徴量の記述されている特徴量テーブルとの関係が表現されている。そのほか、システムの説明や細胞データに関するメモを記述したテキストデータも、認識システムから記述、参照可能である。

2. 3 網膜細胞画像認識システムの機能

網膜細胞画像認識システムは、顕微鏡画像入力・保存部、特徴量計算部、統計解析部、画像

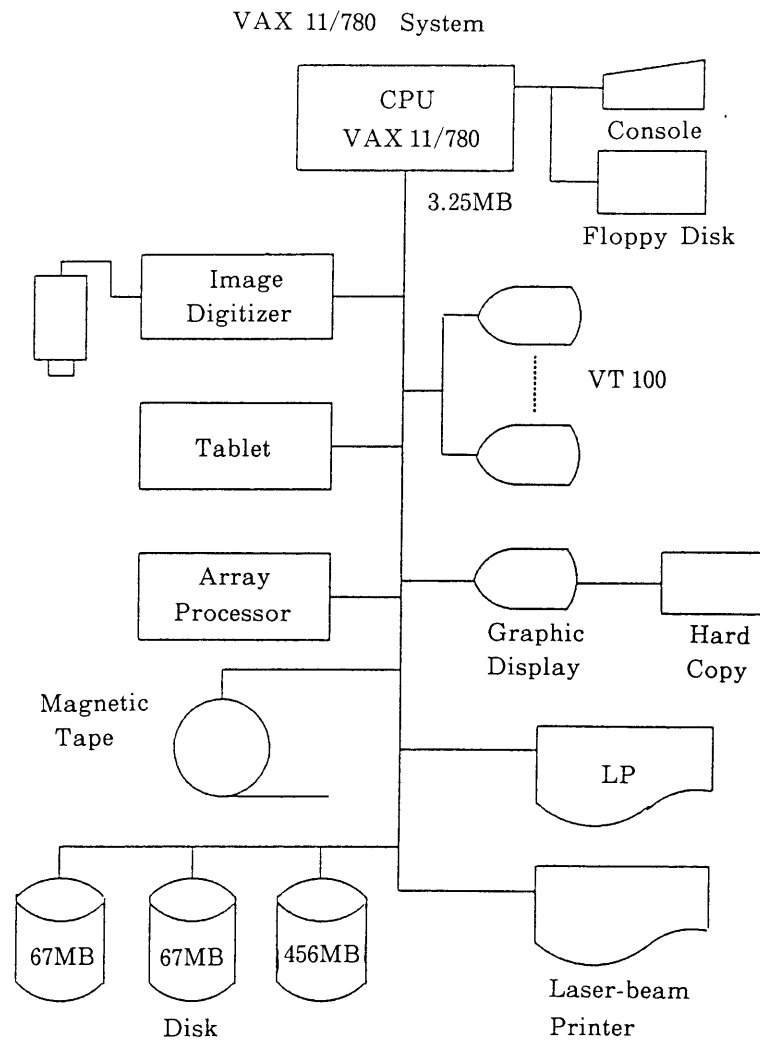


図 2-1 網膜細胞画像認識システムのハードウェア構成図

表示部の四部分で構成される。以下に各部分の機能の概略を述べる。

2. 3. 1 画像入力

画像入力では、図 2-3 のブロック図に示すようにビデオディジタイザからの濃淡画像の読み込み、細胞像抽出のための画像処理による前処理、細胞像抽出、画像データ保存などを行う。

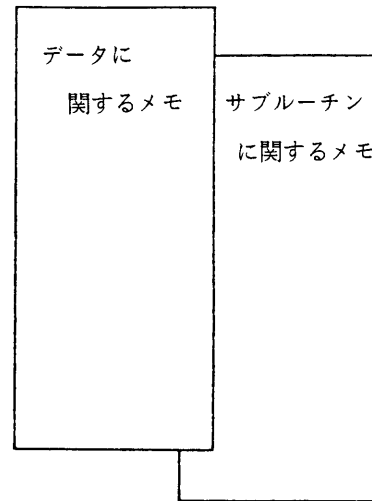
濃淡画像の読み込みは、まず画面の大きさを指定して行う。すなわち、対象とする細胞画像を全画面からか、画面上の一部から読み込むかについて指定する。次に、サンプリング開始点を指定する。濃淡画像にノイズが含まれたり、細胞像のエッジがぼけている場合、メニューに示されたフィルタを選択することにより、細胞像抽出のための前処理が行われる。ここで使用可能なフィルタは、 5×5 局所窓を用い任意の重み付平均を行うもの、メディアンフィルタ、分散値を用いたエッジ強調フィルタ等である^{(73),(74)}。前処理を施した濃淡画像に対し、動的閾

特徴量テーブル

| 特徴量識別名 | |
|--------|-----|
| 1 | データ |
| 2 | データ |
| 3 | データ |
| | |

- ・統計解析・分類
- ・特徴量の計算

メモ用テキストファイル



- ・データ・サブルーチンのメモの参照・記入

細胞名テーブル

| 細胞の個数 | |
|-------|-----|
| 1 | 細胞名 |
| 2 | 細胞名 |
| 3 | 細胞名 |
| | |

- ・統計解析・分類
- ・画像表示

画像ファイル



- ・画像入力
- ・特徴量計算
- ・画像表示

図2-2 網膜細胞画像認識システムのファイル構成図

値化法を用い、画面を2値化し、細胞像を抽出する。抽出した細胞の2値画像は、データ圧縮のため、ビットパターンか、ランレングス法、あるいは、チェインコード法により記述し、画像ファイルを構成する。

なお、画像入力の前処理、画像抽出、保存に関しては、第3章に詳述する。

2. 3. 2 特徴抽出

特徴量の計算に関しては、図2-4に示すように操作者がメニューより選択した細胞画像の形態の特徴量の計算と、細胞体と樹状突起の分離と樹状突起パターンの特徴抽出、細胞体画像および輪郭線近似画像ファイルの生成と、補助機能として、特徴量計算を連続処理するための細胞名リストの作成を行う。

システムにおいて画像処理で計算可能な特徴量は、細胞体画像の面積、長径、短径、周囲長、長径/短径、周囲長²/面積、角の数（頂点の数）、輪郭線を極座標表示した波形の相関係数、線形予測係数などである。また、細胞体画像の輪郭線を最大多角形法、最小2乗法、フーリエ記述子を用い、多角形あるいは曲線近似し、その図形のファイル生成と、近似図形における上記各特徴量を計算できるようにしてデータの圧縮、計算時間の短縮などに資するよう考慮した⁽⁷²⁾。なお、データ圧縮に関しては、第3章に詳述する。

また、細胞画像は、細胞体と呼ばれる丸みを帯びたふくらみと、樹状突起から構成される。樹状突起の分離には、細線化手法を用いて行った。樹状突起の端点、分岐点の位置、樹状突起の本数、突起の角度等の特徴量の計算処理も行っている⁽⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾。さらに、細胞体の形態解析を行う場合が多いので、樹状突起を除去した細胞体画像の画像ファイルの生成を行う。

なお、細線化手法については第4章に、樹状突起の特徴量の計算処理については第5章に詳述する。

2. 3. 3 統計解析

統計解析に関しては、図2-5に示すように、データの追加、変更、特徴量間の四則演算とその結果の特徴量テーブルへの書き込み、任意の細胞像における任意の特徴量の出力、特徴量による検索、分類、ヒストグラム、スキャタダイアグラムの出力等を行う。

細胞ごとに、複数個の特徴量を選択し、それらの四則演算を行い、その結果を特徴量テーブルに追加することも可能である。

検索に関しては、数値データの場合、その最大値と最小値を指定し、文字データの場合には、文字列を指定して、その文字列を含むデータを検索する。また、ある細胞画像のグループが存在するとき、別の細胞画像が、そのグループと類似した特徴を有するか検討するために、そのグループに属する細胞と比較する細胞とのマハラノビス距離を計算し、 χ^2 自乗検定を行い評価できる。さらに、細胞名をキーにした検索も行う。これらの検索は、組み合わせて行うことが

第2章 網膜細胞画像認識システムの構築

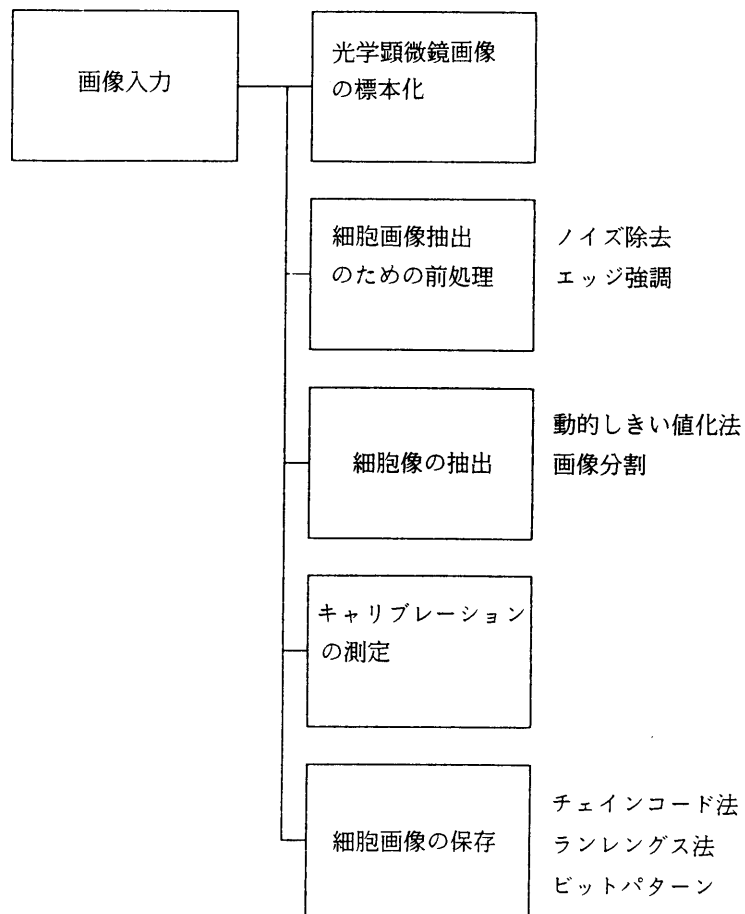


図 2 - 3 網膜細胞画像認識システムにおける画像入力処理の概要を示すブロックダイアグラム

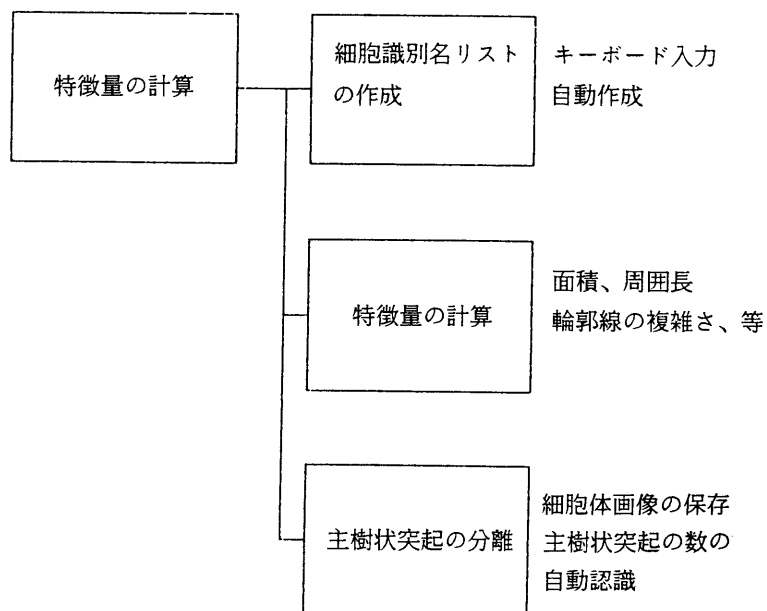


図 2 - 4 網膜細胞画像認識システムにおける特徴量計算処理の概要を示すブロックダイアグラム

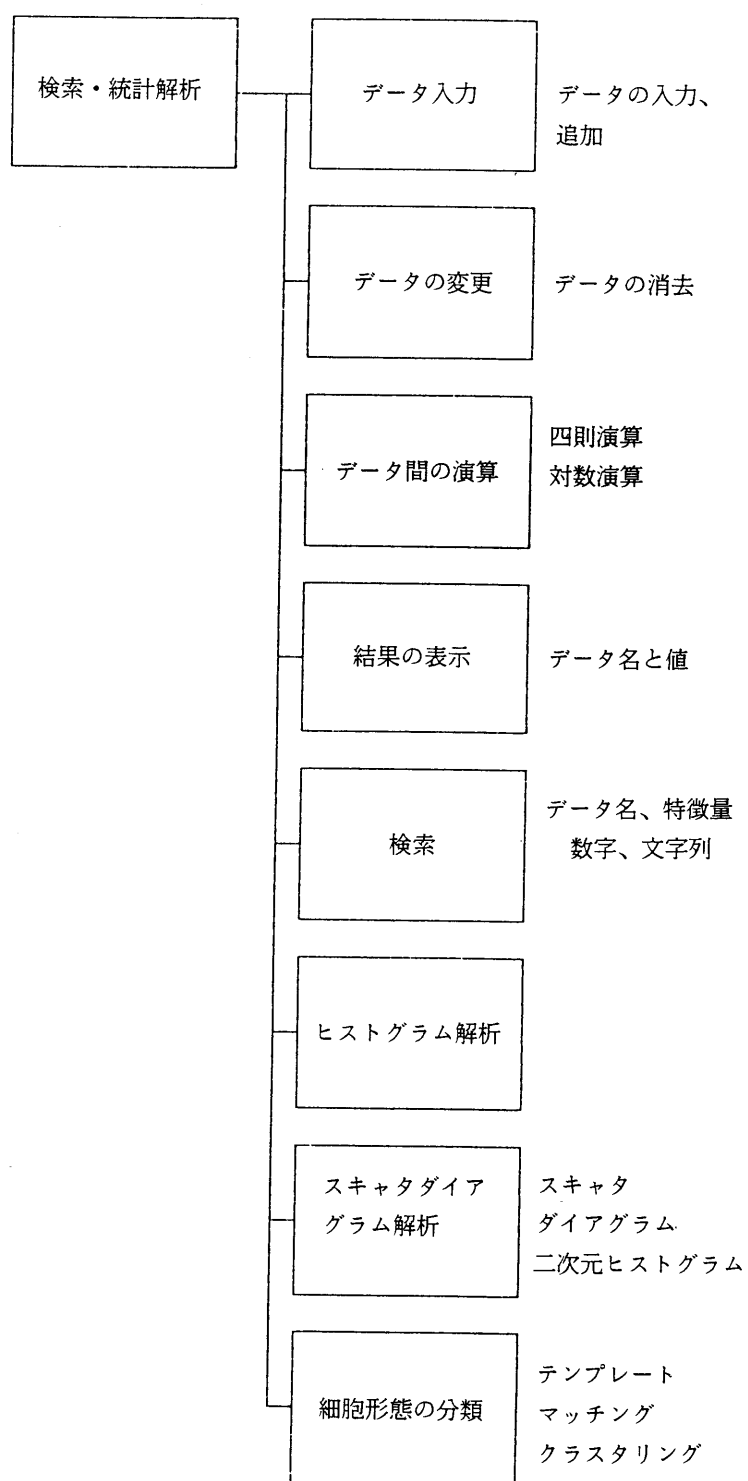


図2-5 網膜細胞画像認識システムにおける統計解析処理の概要を示すブロックダイアグラム

でき、前の結果との結びを取ることも交わりをとることもできる。検索と後述する分類とを組み合わせで行うことも可能で、検索によって抽出された細胞データの集合を対象として分類することも、分類により抽出されたデータの集合を検索することもできる。検索結果は、値、ヒストグラム、スカッタダイアグラム等の形で出力できる。

ヒストグラムは、特徴量を指定し、表示したい値の最大値、最小値、区間数を与えて、指定したグラフィックディスプレイに出力する。スカッタダイアグラムは、2つの特徴量を指定し、その最大値と最小値を指定することにより、グラフィックディスプレイに表示する。あるいは、スカッタダイアグラムを格子で区切り、各格子に含まれるデータ数を対応する位置に数値で表わした二次元ヒストグラムの出力も可能である。この時2つの特徴量の相関係数も計算する。

さらに、特徴量を用いた分類に関しては、第一の方法は、任意のテンプレートを指定し、それと類似度の大きいものから順に選択するテンプレートマッチングがあり、類似度の大きい細胞名から順に、テキストファイルに書き込む。このテンプレートマッチングにおける類似度の距離尺度に関しては、次の3手法⁽⁷⁷⁾を選択できるようにした。

- (1) 特徴量の組で構成される特徴量空間におけるユークリッド距離。
- (2) 細胞体の輪郭線を極座標表示した波形より計算した線形予測係数から求める最尤距離。
- (3) 細胞体画像をその重心を基準に重ね合わせ重なり部分の割合を尺度とする方法。

特徴量空間におけるユークリッド距離に関しては、特徴量の種類、および数は自由に決定できる。

第二の分類方法は、類似度の高いものから順にグループとしてまとめるクラスタリングである。クラスタリングの途中経過におけるグループ間の距離は、最長距離、最短距離、平均距離、重心距離の中から分類目的に応じて選択できる。その結果はグループ分けのプロセスを樹形図としてグラフィックディスプレイに表示したり、適当なグループ分けを行い、各グループ毎に、前述のような検索、ヒストグラム解析等の統計解析を行う。

なお、統計解析処理の方法とその処理例に関しては、第5章に詳述する。

2. 3. 4 画像出力

細胞名の書かれたリスト名と、細胞像のコード化方法を指定することにより、対応する細胞像を指定したグラフィックディスプレイに出力する。また、分類結果のうち、テンプレートマッチングの結果を表示することもできる。

以上をまとめて図2-6にシステム全体の機能と各部分の入出力関係の概略を示す。

2. 4 網膜細胞画像認識システムの運用例とシステム評価

本節では、網膜細胞画像認識システムに関し、そのメニュー例、処理例、並びにシステム評価を行った結果について述べる。

第2章 網膜細胞画像認識システムの構築

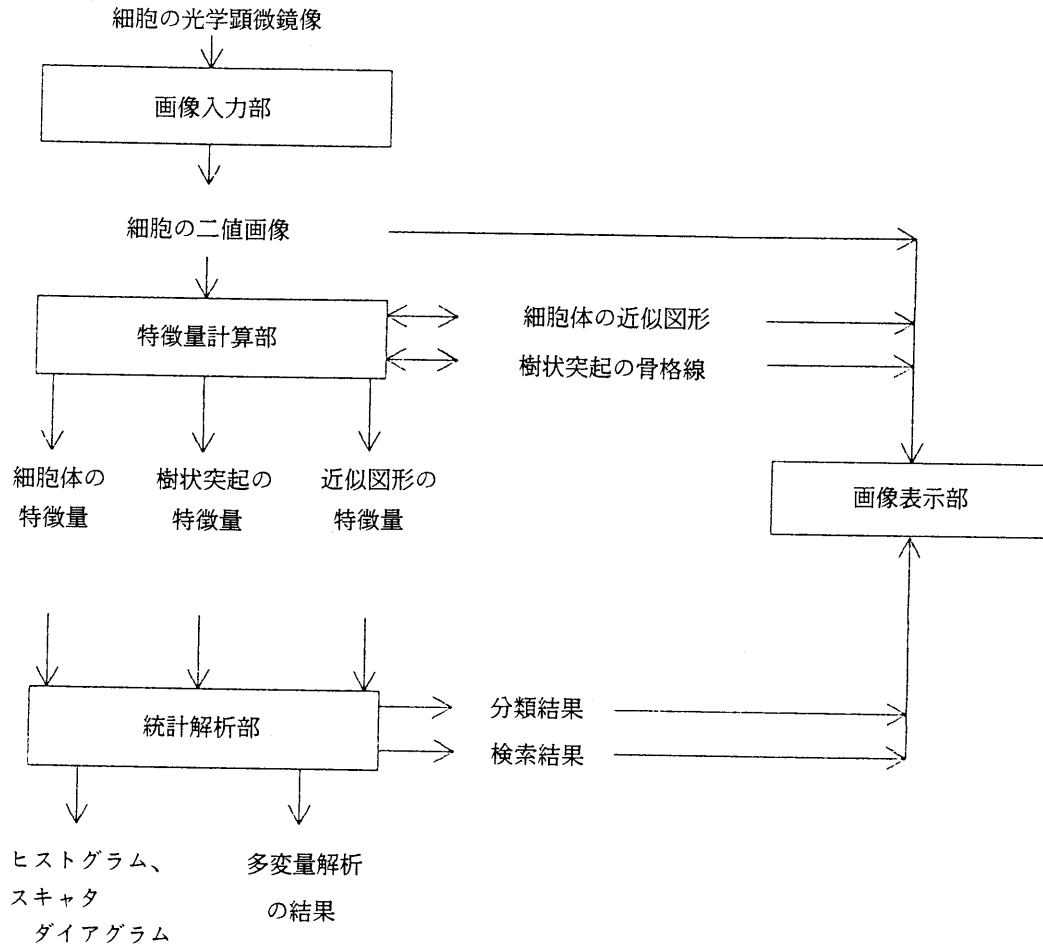


図2-6 網膜細胞画像認識システムの機能に関する概略図

図2-7に認識システムのメインメニューを示す。図2-8にメインメニューの1，すなわち画像入力部を選択したときのメニューを示す。

図2-9は，細胞像抽出のための前処理のメニューを示す。図2-10は画像入力部で画像処理により抽出されたナマズの網膜の神経節細胞画像の例(a)と，特徴量計算部分で抽出した細胞体の2値画像(b)の例である。網膜細胞画像認識システムにおいては，このような細胞画像1000個以上を保存し，解析対象としている。

2値画像の保存におけるデータ容量に関しては，ビットパターンでは，濃淡画像の8分の1にデータ圧縮される。今回の例においては，ランレングス法によりビットパターンの約40分の1，チェーンコード法では，ビットパターンの約70分の1のデータ容量に圧縮することができた。この詳細については，第3章に述べる。

データ圧縮と，特徴量計算の簡略化を目的とし，システムで用意している近似法をナマズの網膜細胞の細胞体画像に適用した結果，輪郭線の頂点の数は，原画像と比較し，多角形近似法である最大多角形法では13%，最小2乗法では37%にデータ圧縮された。また，フーリエ記述子では原画像の頂点の数が平均103画素の画像に対し，次数10までで原画像の特徴をよく保存する再生画像が得られたので，データ圧縮率は約10%と考えられる。細胞体の特徴量

```
***** MORPHOLOGICAL ANALYSIS SYSTEM *****

1. DIGITIZATION : Digitize and storing image data
2. FEATURE EXTRACTION : Calculate morphological parameters
3. CLASSIFICATION & STATISTICAL ANALYSIS : Classify neurons based on
   the morphological parameters and histogram analysis and retrieving
4. DISPLAY : Display image data on TV monitor or graphic display
5. DATA CONTENTS : Display or input memorandum about stored data
6. SUBROUTINE PACKAGE : Manual of subroutine package of image processing

Menu number :
```

図2-7 網膜細胞画像認識システムにおけるメインメニュー

```
***** DATA SAMPLING *****

Sampling process menu

1. Digitizing gray leveled image
2. Preprocessing
3. Making two valued image
4. Measurement of calibration
5. Filing
6. End of process

Menu number :
```

図2-8 網膜細胞画像認識システムにおける画像入力部のメニュー

関しては、面積、長径、短径、長径／短径については、原画像に対し、多角形近似法で8%、最小2乗法で1%、フーリエ記述子は5%以内の変動がみられた。周囲長に関しては、最大多角形法で24%、最小2乗法で6%、フーリエ記述子で26%の減少となった。上記定量データは、細胞体画像に関する特徴量の平均値により求めたものである。なお、この詳細については、第3章に述べる。

図2-11は、特徴量計算部分のメニューである。図2-12は、この中の特徴量計算（図中2）を選択したときのメニューで、システムが用意している計算可能な細胞体形態の特徴量の一覧である。表2-1は、各特徴量を、各10個ずつの細胞体像に関して計算した計算時間を

PREPROCESSING

Which do you input data from digitizer or image file?

(D or F) :

Original gray leveled file name :

1. Making composite image by 3 images.
2. Segment object mass by differenciation.
3. Edge enhancement by dfferenciation.
4. 3 +search edge connection.
5. Edge enhancement by gradient.
6. Matrix filtering.
7. Nonlinear smoothing.
8. Median filter (1-d & 2-d).
9. Minimum & maximum filter.
10. 3*3 linear smoothing filter.
11. Edge enhancement by variance.
12. Reversing.
13. In case you want to know how the above filter.
14. End of process.

Menu number :

図2-9 網膜細胞画像認識システムにおける前処理のメニュー

示す。画像処理で特徴抽出を行うため、認識システムの処理の中では、最も計算時間が長くなる部分である。

図2-13は、統計解析のメニューを示す。図2-14は、統計解析の一例としてヒストグラム表示（図中6）を選択し、1000個のナマズ網膜細胞の細胞体の面積(a)と主樹状突起の本数(b)のヒストグラムを描いたものである。ナマズの網膜細胞の細胞体の面積は、平均が約 $100(\mu\text{m})^2$ で面積の大きい方へ広がった分布を示していることがわかる。主樹状突起の本数は、3, 4本のものが多いことがわかる。

図2-15は、統計解析の例として検索（図中5）を選択して解析を行った結果である。(a)は、117個の細胞体の長径・短径比のヒストグラムを求めたものである。(b)は、長径/短径に関して、1.5と1の範囲で検索した細胞体像の長径/短径のヒストグラムを示す。検索された数は、59個であった。(c)と(d)は、(a)(b)の細胞体像に関する面積のヒストグラムである。(d)は(c)と比較して面積の小さい方への偏りが大きいことから、長径/短径が1に近いもの、即ち、丸い細胞体の面積が、細長いものより小さい傾向にあることがわかる。

図2-16は、統計解析の例として細胞形態分類（図中8）を選択しその結果を表示した例である。(a)は各列左端の細胞体をテンプレートとしたテンプレートマッチングの結果、(b)

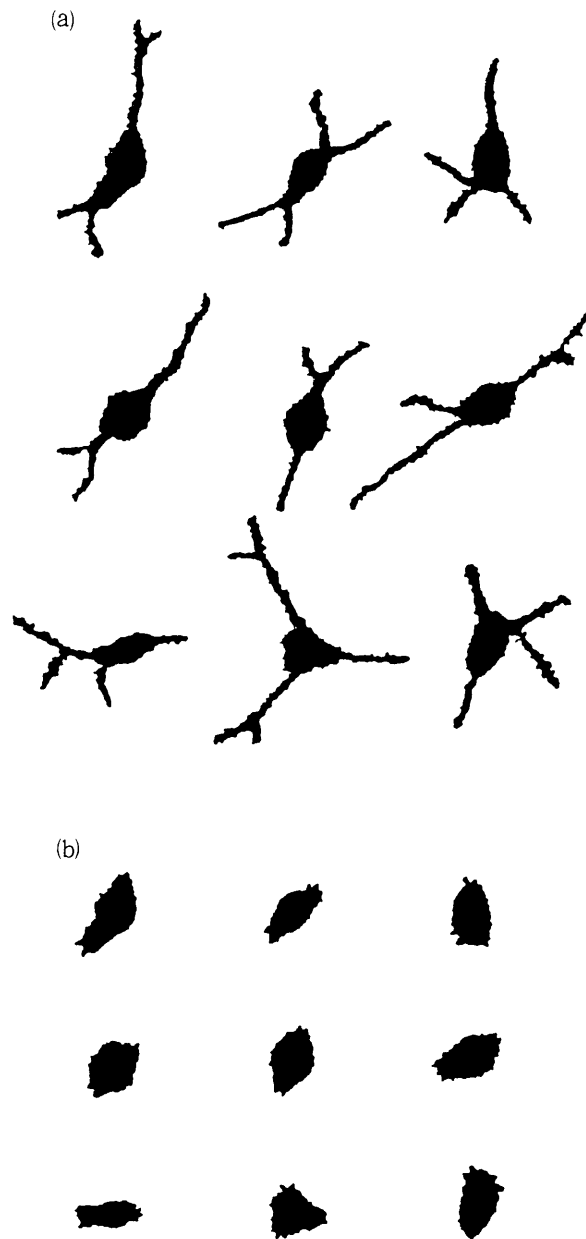


図2-10 網膜細胞画像認識システムにおいて扱われるナマズ網膜の神経節細胞の2値画像例

(a) 主樹状突起と細胞体を持つ細胞画像 (b) 細胞体画像

は、クラスタリングのプロセスを表示した樹形図である。

図2-17は、画像表示のメニューを示す。図2-16(a)は、統計解析部分でテンプレートマッチング処理を行い、その結果をテキストファイルに細胞の識別名で記述し、図2-17のメニュー1において描いた結果である。

```

*****                                FEATURE DETECTION                                *****

Feature detection process menu

1. Making name list file.
2. Calculating feature parameters.
3. Cutting and counting principal dendrites.
4. End of process

Menu number :

```

図2-11 網膜細胞画像認識システムにおける特徴量計算のメニュー

```

*****                                CALCULATE PROCESS                                *****

Feature parameter menu

1. Area
2. Center of gravity
3. Major & minor axes
4. The ratio of major axis & minor axis
5. The coefficients of auto-correlation
6. The Fourier coefficients
7. Circumference
8. The ratio of the square of circumference and area
9. Average & variance of the radii
10. End of process

Menu number :

```

図2-12 網膜細胞画像認識システムにおいて抽出可能な細胞体形態の特徴量の一覧

表2-1 10個の細胞体像に関する特徴量の計算時間

| 特 徴 量 | CPU 占有時間 |
|----------------------|----------|
| 面 積 | 6'04" |
| 重 心 | 2'36" |
| 周 囲 長 | 6'22" |
| 長径と短径 | 2'53" |
| 長径/短径 | 2'52" |
| 半径の平均と分散 | 2'49" |
| 周囲長 ² /面積 | 6'10" |
| 自己相関係数 ($r=10$) | 2'46" |
| フーリエ級数 | 3'11" |

WELCOME TO THE DATABASE SYSTEM

May I help you?

Please key in the number, what you want to do

1. Reading new data.
2. Modifying the old data.
3. Calculating two or more data.
4. Making the list of the stored data.
5. Table searching.
6. Making the histogram of the data.
7. Making the scatter diagram of the data.
8. Morphological classification.
9. Finishing the all process.

Menu number :

図2-13 網膜細胞画像認識システムにおける統計解析処理のメニュー

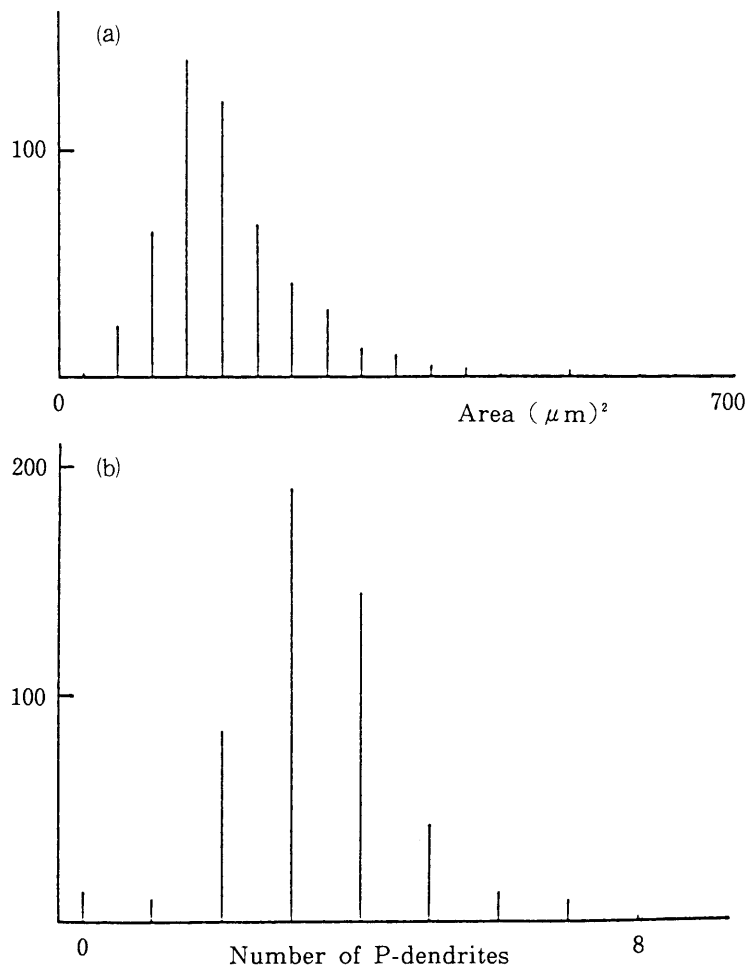


図2-14 網膜細胞画像認識システムにおける解析例 (その1)

(a) ナマズ網膜の神経節細胞の細胞体の面積のヒストグラム

(b) ナマズ網膜の神経節細胞の主樹状突起の本数のヒストグラム

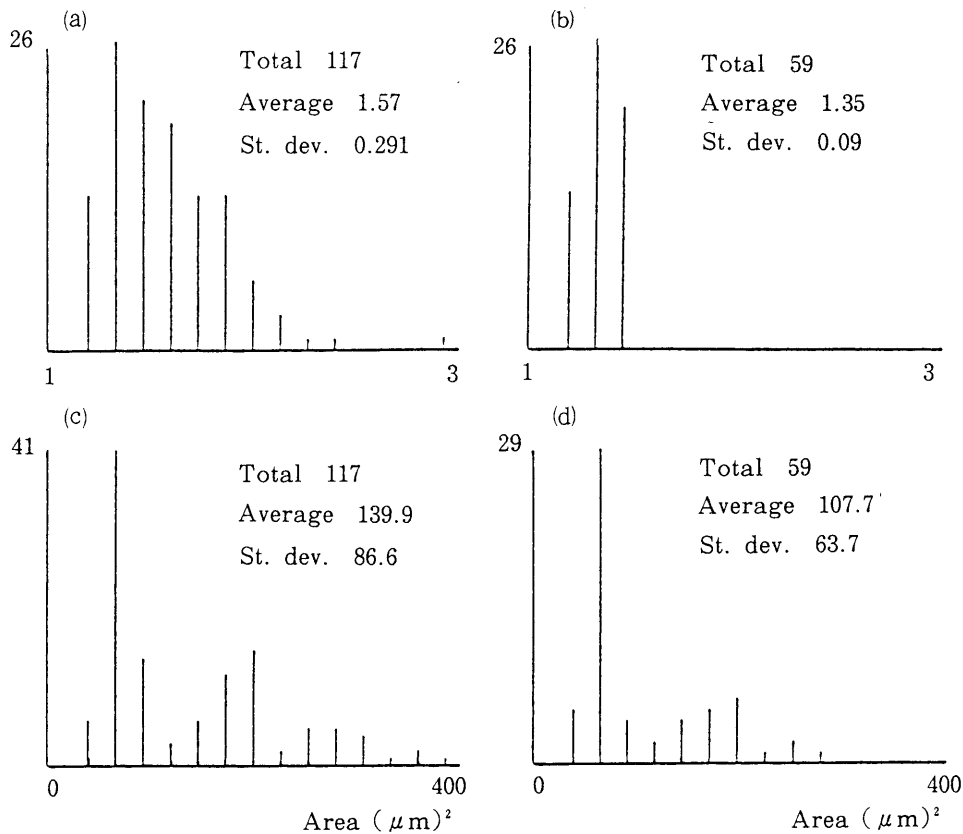


図2-15 網膜細胞画像認識システムにおける解析例 (その2)

- (a) ナマズ網膜の神経節細胞の細胞体 117 個の長径/短径のヒストグラム
- (b) 細胞体の長径/短径を 1~1.5 の範囲で検索した長径/短径のヒストグラム
- (c) (a) と同一細胞の細胞体の面積のヒストグラム
- (d) 長径/短径を 1~1.5 の範囲で検索した細胞像の細胞体の面積のヒストグラム

2. 5 網膜細胞画像認識システムに関する考察

網膜細胞画像認識システムは、多数の細胞画像の各種の特徴量を保存し、統計解析、検索、分類等を行い、細胞の形態、機能等の解析のための研究支援用システムである。従って、研究者が計算機の扱いに慣れていない場合でも簡単に操作できるように、メニュー表示による対話型処理を基本とした。さらに入力の際予期しないデータ入力があった場合、再度入力をうながしたり、特徴量テーブルへ、キーボードよりデータを入力する場合、常に値の確認も行っている。また、解析結果の出力先に関して、端末、グラフィックディスプレイ装置、プリンタ等、操作者が自由に選択することができるようにした。

本システムでは細胞画像の近似図形を用いることによって特徴量の計算時間の軽減と保存のためのデータ圧縮を考慮した点に特徴がある。

なお、ここに述べたシステムは、既存のデータベースシステムを用いることなく、専用システムとしての設計を行った。それは、現在までの生物学、医学の分野でのデータベースは、病理標本⁽⁵⁴⁾、診断画像⁽⁵⁵⁾、症例等のコンサルテーションシステム⁽⁷⁸⁾等が主で、細胞の形態、機能に関するシステムは存在せず、したがって、既存の汎用データベースシステムを用いる場合、

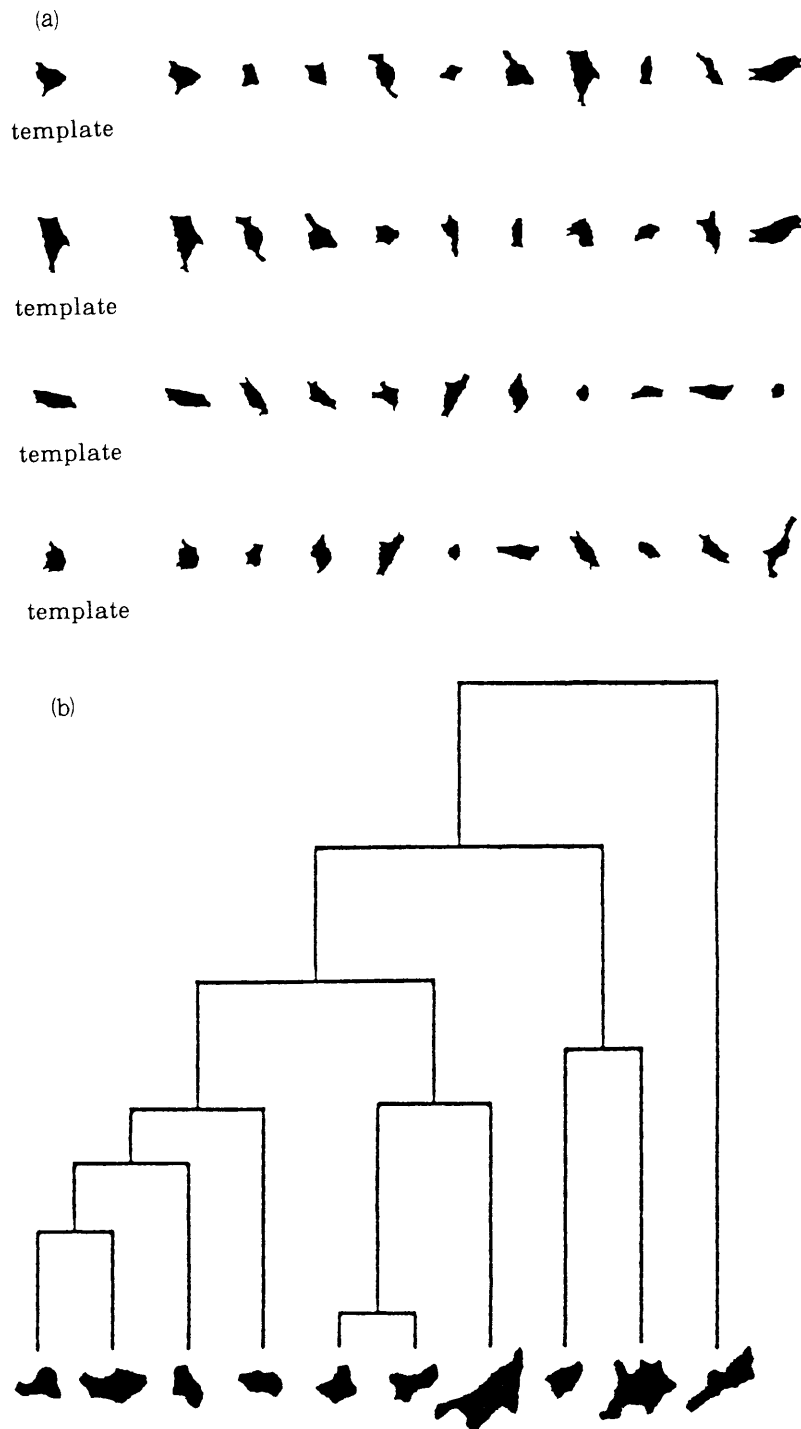


図2-16 形態分類結果の表示例

- (a) ナマズ網膜の神経節細胞に関して各列左端の細胞体をテンプレートとしてテンプレートマッチングを行った結果
- (b) ナマズ網膜の神経節細胞に関して、図示した10個の細胞体を対象にクラスタリング処理を行い、その分類の過程を示した樹形図

```

*****                                DISPLAY PROCESS                                *****

Display process menu

1. Classified result.
2. Name list file data.
3. End of process.

Menu number :

```

図2-17 網膜細胞画像認識システムにおける表示処理のメニュー

かなりの変更，機能追加が必要と考えられたからである．また，画像の収集から保存，特徴量計算，統計解析等を総合的にを行い，生物学の研究者が意図する解析結果を提供するためには，設計段階において研究者の解析意図のフィードバックが必要である．さらに，本研究の最終目的は，現在の形態解析の結果と細胞の機能の解析⁽⁷⁹⁾の結果とを統合し，形態と機能の関連の解析を行うことにある．それを実現するための拡張性を考慮すると，機能に関する解析システムが専用システムであるため，それとの結合を容易に行うことが必要であった．以上の理由により専用システムを開発した．しかし，統計処理等に関しては既存の処理パッケージの追加は容易に行えるので，科学技術計算，多変量解析に関して一部それらの利用を行っている．

2.6 むすび

本章では，生物学における網膜細胞形態解析を目的とする画像認識システムの概要を述べた．システムは，多数の解析プログラムの集合体と，特徴量テーブル，画像データファイルから構成されている．これは，主に細胞の形態に関する解析を目的として開発を行ってきたが，現在のシステムで，例えば，網膜に各種光刺激を照射した際の反応インパルスの頻度分布の解析，網膜に白色雑音を照射した時の受容野パターンの解析，入力白色雑音と出力インパルスより計算される二次カーネルの形状解析などが可能であり，そのような応用も行った．したがって，これらを統合し，形態と機能に関して総合的に解析を行うシステムへ拡張が可能である．

さらに，本システムは，生物学の分野における細胞形態解析という目的のみにとどまらず，画像データと画像から抽出した特徴量であるコードデータの混在した一般的なデータベースとして用いることもでき，例えば医用分野における画像管理，多数の顕微鏡画像等を扱う臨床検査，工場の生産ラインにおける部品管理等各種応用も考えられる．さらに，画像解析，統計処理の手法や使用するパラメータの選択法に生物学の研究者の従来までの経験を反映させることにより，システム内で解析方法，パラメータ等の自動選択を行い，より正確に容易に研究者が意図する解析を行うエキスパートシステムへの改良も可能と考えられる．

次章以降において，本システムの画像処理，検索方法等の理論，アルゴリズムの詳細及び本システムにより解析を行った結果について述べる．

第3章 画像処理による細胞像データの収集と保存 およびデータ圧縮

3.1 はしがき

生物学の分野においては、神経細胞の形態と機能との関連の解析⁽⁶⁷⁾や細胞形態の分類^{(80),(32)}等が重要な研究テーマとなっている。このような解析を行うためには、多くの細胞像を計算機に保存し、検索、特徴量の統計解析などを行う画像データベースの設計が必要となる。この問題に対し、従来までの計算機による神経細胞の形態解析は、樹状突起の枝分かれパターンの解析^{(36),(44)}、細胞像の三次元像再構成^{(41),(42)}等、一つの像を詳細かつ正確に記述する試みに力点が置かれてきた。このため、一つの細胞に関する記述において、多くの記憶容量と計算時間とを必要とした。従って、画像データベースのように多数の細胞像を用いる処理には、これらの解析はあまり効果的ではない。そこで、本研究では、これらの問題を解決する目的で、一つの細胞像の形態を少数のパラメータで記述して特徴づけを行うため、細胞像については、細胞体と主樹状突起のみに着目した。また、ここで取り扱う細胞は網膜細胞であるので、平面的な取り扱いが可能で、2次元像として計算機解析を行うことにより多数の細胞像の処理が可能となった。

本章では、まず、網膜細胞の光学顕微鏡像からの細胞像と細胞体像の抽出、保存手法を提案する。ビデオディジタイザで標本化した画像に関する顕微鏡の光学系からの照明むら、焦点ずれによるボケ等の問題に対し、画像処理によりノイズ除去、エッジ強調、ボケ除去を行った。前処理を施した濃淡画像に閾値処理を行い細胞体と主樹状突起より構成される細胞像を抽出した。さらに、細胞像に関しては、細胞体と主樹状突起を計算機で切り離して細胞体像を抽出した。

次に、多数の細胞像の解析を可能とするため細胞像をデータ圧縮し保存するための2値画像、輪郭線像の記述方法を論ずる。輪郭線は、チェーンコードを用い符号化し、2値画像は、ランレングス法により符号化することで、データ圧縮を試みた。また、細胞体像に関しては、図形の1次元データおよび2次元データの代数的特徴付けを行うことによる記述を検討している。

また、細胞体の形態を簡単化する試みとして輪郭線近似図形による細胞体像の記述に関する検討を行った。近似による記述に関しては、原画像と近似図形の特徴量の比較、データ圧縮率、および、原画像を用いた形態分類と近似図形による分類結果の比較を行った。この分類結果の比較の方法に関しては、新しい定量的な評価方法を提案して細胞体に適用した結果についても述べる。

3. 2 細胞像データ抽出のための画像処理による前処理

形態解析処理においては、主にナマズ網膜の神経節細胞の光学顕微鏡像を用いた。これをビデオディジタイザ（SD 社製 OSCON）で標本化し、計算機への入力画像とした。図3-1は、標本化した細胞像の一例である。写真中央に黒く染まっているのが、メチレンブルー法で染色された神経節細胞である。入力画像は、 640×480 画素で、濃淡レベルは 256 レベルである。細胞像中央のふくらみのある部分を細胞体、それから出ている突起を主樹状突起という。この写真では、観測されないが、実際の細胞には、この主樹状突起より枝分かれした複雑な樹状突起が広がっている。細胞体の直径は約 $30 \sim 40 \mu\text{m}$ で、入力画像は 60 倍に拡大した像を用いた。本処理では、形態上主要な情報として、細胞体と主樹状突起のみに着目した。

図3-1の写真のように、入力濃淡画像は、ノイズ、エッジのぼけを含む場合がある。この問題を解決するため、画像処理の手法を用い、ノイズ除去、エッジ強調およびぼけ除去の処理を行った。

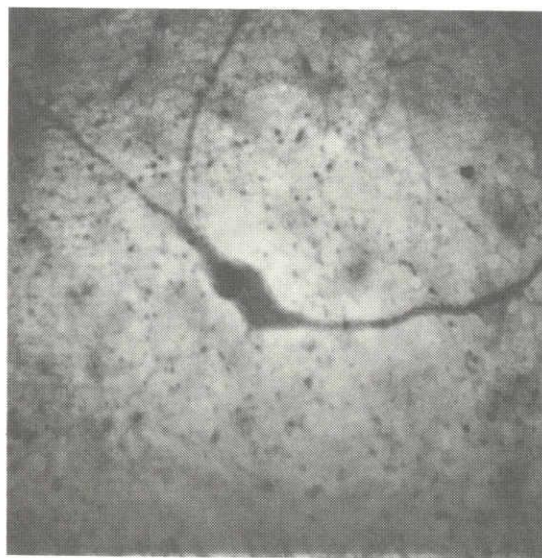


図3-1 メチレンブルー法で染色したナマズ網膜の神経節細胞の光学顕微鏡像を標本化した例。画面の解像度は 640×480 、濃淡レベルは 256 レベルである。

3. 2. 1 濃淡画像におけるノイズ除去方法

まず、ノイズ除去の方法について述べる。濃淡画像のノイズを除去するためには、一般には線形平滑化フィルタが用いられる^{(81),(82)}。その例としては、 $n \times n$ 局所窓の中央画素の値を窓内の平均値で置き換え実現するもの、あるいは窓内の中央から外側に重みを小さくする重み付き平均値で実現するもの、さらに画像を2次元フーリエ変換し、周波数領域におけるローパスフィルタを用いるもの等がある。しかし、線形平滑化フィルタは、ノイズの除去だけでなく、エッジが滑るという欠点を持っている。そこで、それを補うための非線形フィルタの例として、局所分散値を用い、近傍領域を局所分散値が最小となるように定め、その領域の中央画素の値

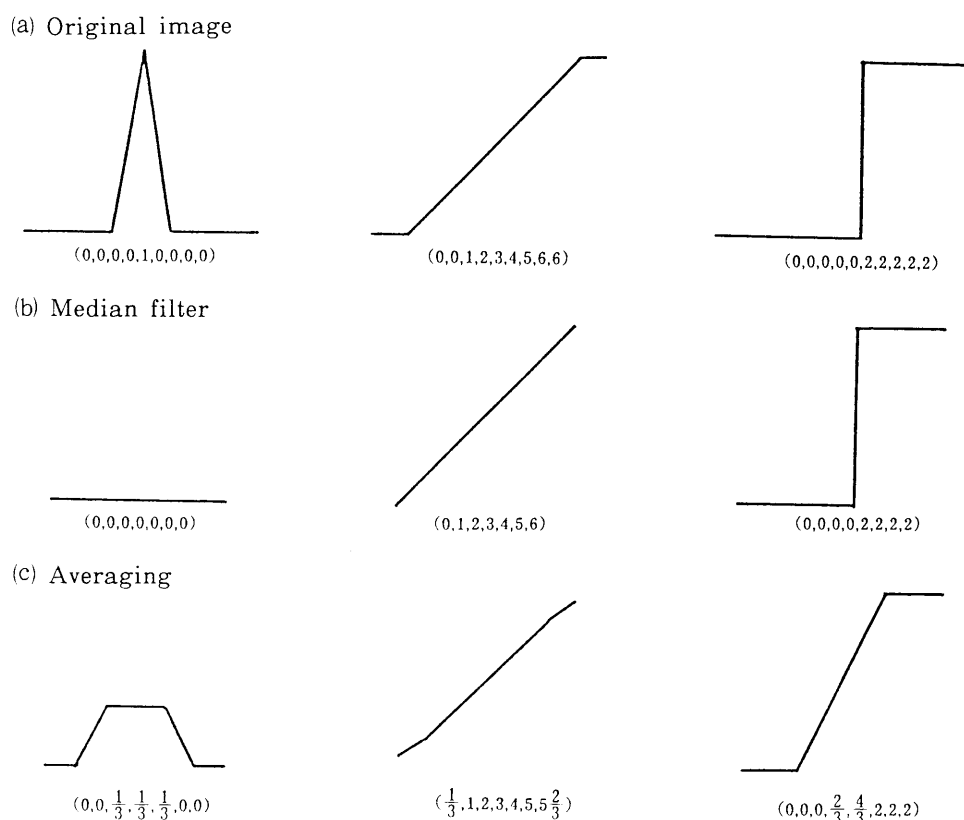


図3-2 孤立点、ランプエッジ、ステップエッジの模式図を用いたメディアンフィルタと平均値による平滑化フィルタの比較。図下の数値は画素値を表す。

(a) 孤立点（左）、ランプエッジ（中央）、ステップエッジ（右）の原画像

(b) (a) に対する局所窓の大きさ3のメディアンフィルタの適用結果

(c) (a) に対する局所窓の大きさ3の平均値フィルタの適用結果

を近傍領域内の平均値で置き換える方法が提案されている⁽⁸¹⁾。この方法は、計算量が多く処理時間が長くなる。

本研究における細胞画像認識システムでは以下に述べる2つの非線形ノイズ除去フィルタを使用可能とした。すなわち、

- (1) 3×3 局所窓において局所分散値を計算し、分散値が閾値以上の場合、その点はエッジの候補点として平滑化は行わず、分散値が閾値以下の時のみ局所窓内の平均値で中央画素の値を置き換える平滑化を行う手法である。これによりエッジの滑りは軽減された。また、従来の非線形フィルタと比較して手続きが簡略で計算量も少なかった。
- (2) ノイズ除去方法として、メディアンフィルタを利用する⁽⁸³⁾。メディアンフィルタは、局所窓の中央の値を局所窓内のメディアン値で置き換える手法である。図3-2(a)に示す孤立点、ランプエッジ、ステップエッジの例に対し(b)メディアンフィルタを適用した結果、(c)平均値によるフィルタ((b)(c)何れも3画素の窓を用いた)を適用した結果を示す。図下の数値は、画素値を表している。この結果から、メディアンフィルタは孤立点のようなゴ

マ塩雑音の除去に効果があり、さらにランプエッジあるいはステップエッジは平滑化しないという長所がある。メディアンフィルタの局所窓の設定方法に関して、2次元窓を用いることも1次元の窓を用いることもできる⁽⁸⁴⁾。1次元窓を用いると各行独立に計算できるため並列処理が可能であり計算効率が高くなる。

図3-3(a)にノイズを含む原画像の水平方向と垂直方向のプロフィールを示す。この原画像に(b) 3×3局所窓を用いたメディアンフィルタ、(c) 9×1局所窓を用いたメディアンフィルタ、(d) 3×3局所窓の平均値による線形フィルタ、(e) 3×3局所窓の分散値を用いた非線形フィルタを適用した際の、(a)と同一の位置のプロフィールを示す。(b)と(c)の比較により、水平方向のプロフィールに関しては(b)(c)何れも平滑化が行われているが、特に水平方向の窓が大きい(c)の方が平滑化の度合いが大きい。垂直方向に関しては(b)の方がより平滑化されていることがわかる。しかし、濃淡画像全体では大きな相違はみられなかった。また、その他の手法に関しては、平滑化の効果が最も大きいものは(d)の3×3局所窓の平均値を用いたものであった。しかし、エッジもかなり滑っている。従って、細胞像抽出の前処理に適しているのは、エッジは保存し雑音除去のみを行うメディアンフィルタ(b)(c)および非線形フィルタ(e)であることがわかる。特に、非線形フィルタはノイズ除去効果はあるが、エッジは保存し処理の手続きも簡略で画像認識システムに適した手法であった。

3. 2. 2 細胞像データ抽出のためのエッジ強調法

ここでは、エッジを強調するためのフィルタについて述べる。一般にエッジを強調するためには、ラプラシアンフィルタ等の線形高域強調フィルタが用いられる⁽⁸⁵⁾。しかし、これらのフィルタは、エッジだけでなく、ノイズも強調してしまう。従って、本研究では、画面内の各画素を、エッジの候補点とそうでない画素に分け、エッジの候補点のみの強調を行った。以下に、筆者らが検討したエッジ強調のための3つのアルゴリズムについて述べる。

- (1) 画面内の各画素が、エッジか否かを判定するために、その水平および垂直方向のグラジェント値を用いた。ある画素のグラジェント値は、それを中心とする3×3の局所窓を用いて計算した。グラジェント値の絶対値が大きいところはエッジとみなし、ラプラシアンフィルタにより強調した。グラジェント値が小さい領域は3×3局所窓の平均値を用いた平滑化を行った。このアルゴリズムは、画面内に多くのノイズを含む場合には不向きであるが、全体にぼけた画面に対しては有効であることがわかった。
- (2) 画面全体の各画素について、水平および垂直方向のグラジェント値を計算する。グラジェント値の絶対値が大きい画素は、エッジかノイズである。それらの画素に関して、ラプラシアン値を計算し、その絶対値の大きいところはノイズ、小さいところは、エッジと決める。エッジはラプラシアンフィルタで強調し、ノイズは、その周り3×3局所窓の平均値で置き換え平滑化した。この手法では、ノイズはあまり強調されなかった。

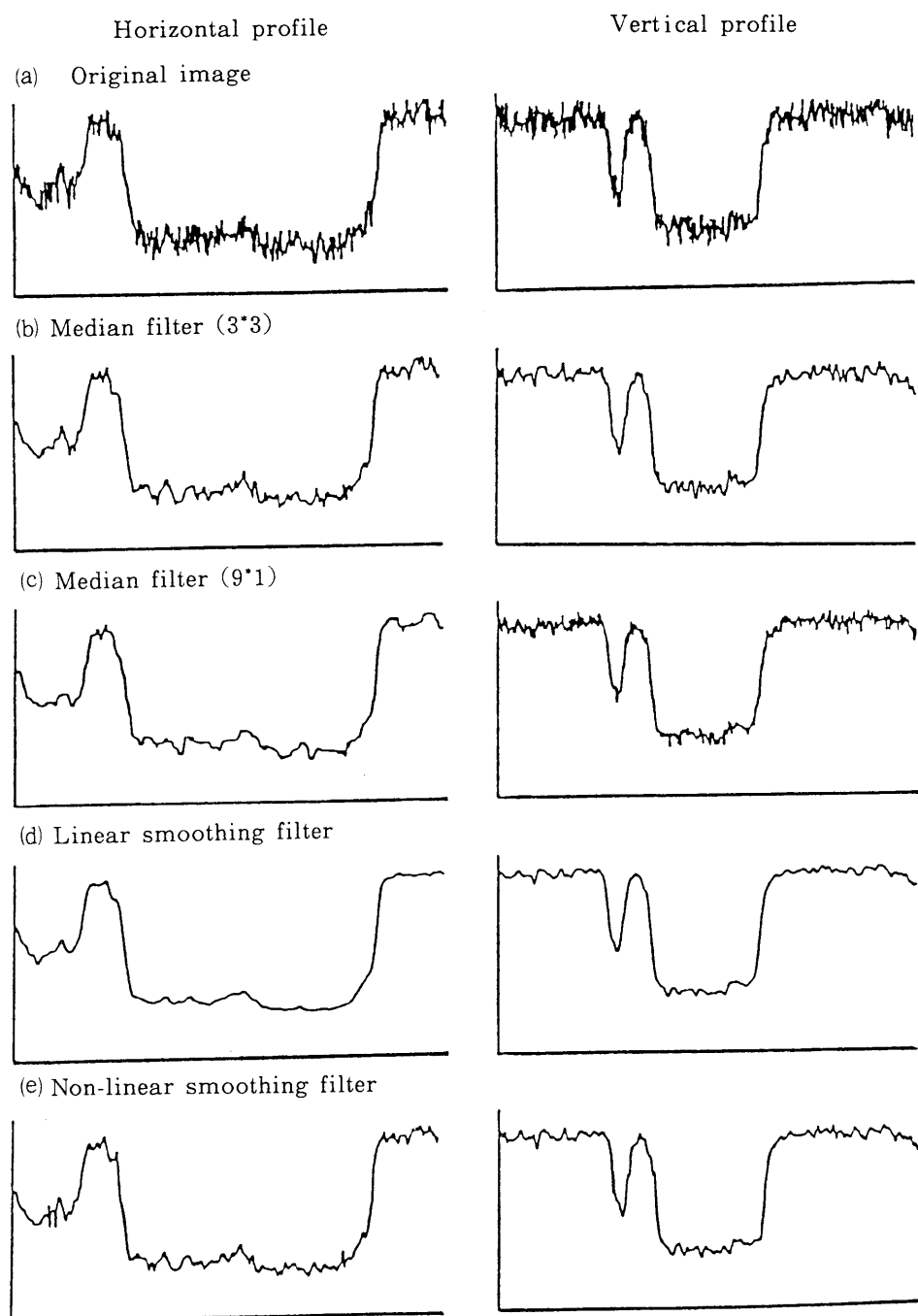


図3-3 濃淡画像の水平および垂直方向のプロフィールによる各平滑化フィルタの効果の比較

(a) 原画像 (b) 3×3 局所窓を用いたメディアンフィルタ (c) 9×1 局所窓を用いたメディアンフィルタ (d) 3×3 局所窓の平均値による線形平滑化フィルタ (e) 3×3 局所窓の分散値が閾値以下の場合のみ平滑化を行う非線形フィルタ

(3) 画面内の各画素を中心として、 5×5 局所窓を考える。その窓内の画素の濃淡値の分散値を計算する。分散値の大きい窓の中央にある画素は、エッジ上の点とみなす。エッジとみなされた画素に関しては、その画素値と、窓内の画素の分散値を加算することにより強調した。その他の画素に関しては、 3×3 局所窓の平均値による平滑化を行った。

図3-4(a)に原画像の水平方向のプロフィールを(b)(c)(d)には同じ画面に上記(1)(2)(3)のエッジ強調手法を適用した画面の同一箇所のプロフィールを示す。この結果よりエッジ強調の効果が顕著な手法は(2)と(3)であった。しかし、(2)の手法を適用して得られた図3-4(c)のプロフィールにおいてはノイズも強調している。従って、細胞像抽出の前処理に適したエッジ強調手法は(3)であった。

3. 2. 3 画像処理による顕微鏡画像の焦点ずれの補正

顕微鏡の光学系に起因するエッジのぼけ除去の方法を新たに提案する。本研究に用いた網膜細胞像は、ほぼ平面的な形態をしているが、完全に一平面に存在するとは限らない。また、光学顕微鏡の焦点深度は浅い。従って、顕微鏡の焦点ずれにより細胞の一部がぼける場合がある。そのぼけを除去するため、まず、一つの細胞像に関して、光学顕微鏡の焦点を、わずかな範囲で、2~3段階変化させ、2~3枚の画面を標本化した。そして、それら2~3枚の画面を合成して一枚の全体に焦点のあった画面を構成した。

画面を合成するに当たっては次の手順により実施した。(1)全画面の全画素でグラジェント値を計算する。(2)グラジェント値の大きいところはエッジの候補点とし、小さいところは背景もしくは対象物上の画素とする。(3)エッジの候補点に関しては、入力画面の同じ位置を表す画素において、グラジェントの絶対値が最大となる画素の濃淡値を合成画面の画素値とする。すなわち、最も急峻なエッジを選択する。(4)エッジ以外の画素に関しては、背景が対象物より明るい場合、同じ位置を表す画素の中で最も暗い画素の画素値を合成画面の画素値とする。図3-5に、輪郭線の細い部分は焦点が合い太い部分はエッジがぼけていると仮定し、その方法を模式図により示す。

3. 3 細胞像の抽出方法

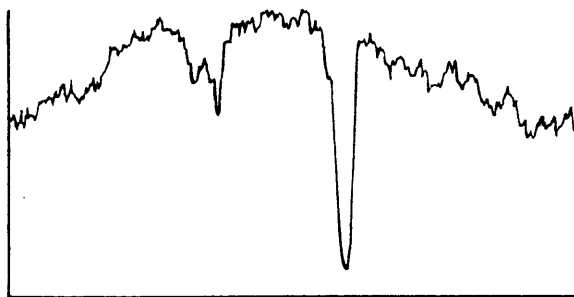
前処理を施した画面に対して閾値処理を行い、画面を2値化して細胞を抽出した。本研究に用いた画面では、細胞と背景のコントラストは、必ずしも画面全体で一様ではない。従って、画面をいくつかの領域に分け、各領域ごとに異なった濃淡値の閾値を与える動的閾値化法⁽⁸²⁾を用いて画面を2値化した。

2値化における閾値の決定法に関しては、 p -タイル法、モード法等いくつか提案されている^{(82),(85)}。しかし本研究では、閾値の決定は、画面上で境界付近をカーソルで指定し、その画素値を閾値とし、操作者が画面を見ながら対話型でその閾値を修正していく方法を採用した。

(a) Original image



(b) Gradient



(c) Gradient+Laplacian



(d) Variance



図3-4 非線形エッジ強調フィルタの効果の比較

(a) 原画像の水平方向のプロフィール (b) 3×3 局所窓の水平および垂直方向のグラジェント値が閾値以上の画素のみエッジ候補点としてラプラスフィルタにより強調 (c) 3×3 局所窓のグラジェント値が閾値以上でかつラプラス値が別の閾値以下の画素のみラプラスフィルタにより強調 (d) 5×5 局所窓の分散値を窓の中央画素に加算し強調

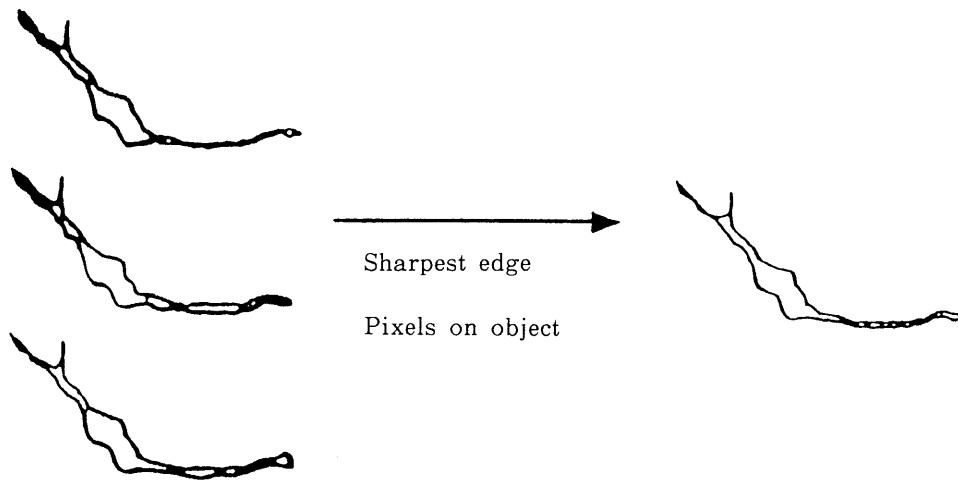


図3-5 顕微鏡の焦点ずれに起因するボケ除去の手法。左の3画像はわずかに焦点深度を変化させた顕微鏡画像を表す。細い輪郭線は焦点がっていることを、太い輪郭線はボケを含むことを表す。左3枚に関しエッジにおいて対応する画素でグラジェント値が最も大きい画素のみ抽出合成した画像を右に示す。

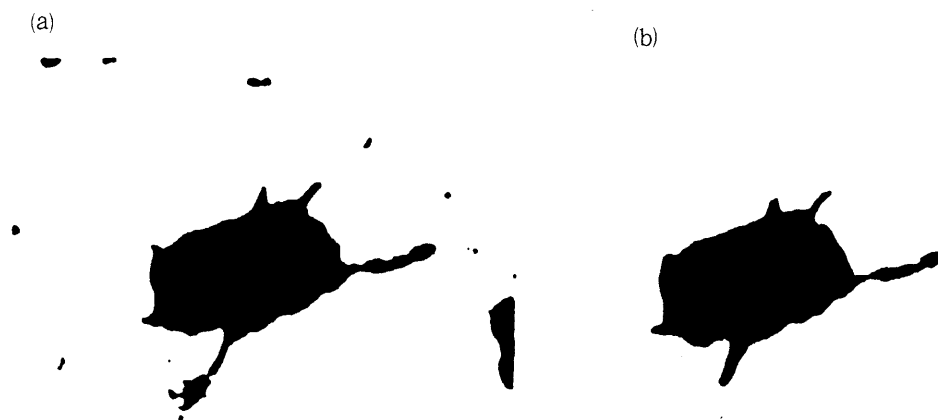


図3-6 (a) 動的閾値化法により2値化した画面と (b) 細胞像のみ抽出した結果

2値化した画面内には、細胞像のみならず、視神経繊維等のアーチファクトが含まれる。その画面から細胞のみ抽出するため、細胞上の一点を指定し、その点の連結成分のみを抽出した。図3-6に入力画像を2値化した結果および抽出した細胞像を示す。

3. 4 細胞像からの細胞体と主樹状突起の分離法

形態の特徴量を計算するために、まず、細胞体と主樹状突起を分離した。主樹状突起の形態的定義は、正確にはなされていないが、ここでは、細胞の幅の狭い部分を主樹状突起とした。

細胞体を以下の手法により抽出した。細胞の2値画像を用い、その輪郭線に、値1を付与する。次に、値1を付与した画素を取り去った画像の輪郭線に値2を付与する。すなわち対象物上の各画素に関して、最も近い輪郭線上の画素との距離の値を各画素に割り付ける距離変換を行った⁽⁸⁶⁾。この画像において、幅が $2k$ 以上の部分を細胞体として抽出する。抽出する方法は、画素値が k 以下、すなわち輪郭線からの距離が k 以下の全ての画素に関して、その座標値を (x, y) とする。そして、 (x, y) を中心とし、辺の長さが $2(k-1)+1$ の正方領域内の画素値を点検する。その正方領域内に、少なくとも一つ値 k 、すなわち輪郭線からの距離が k の画素があれば、正方領域の中央に位置する画素は、幅が $2k$ より広い部分に存在する。すなわち、画素 (x, y) は、細胞体上にあるとした。この操作を、値 $m(m \leq k)$ の全ての画素に関して行った。

図3-7に、細胞像および細胞体と主樹状突起を分離し別々に表示した結果を示す。

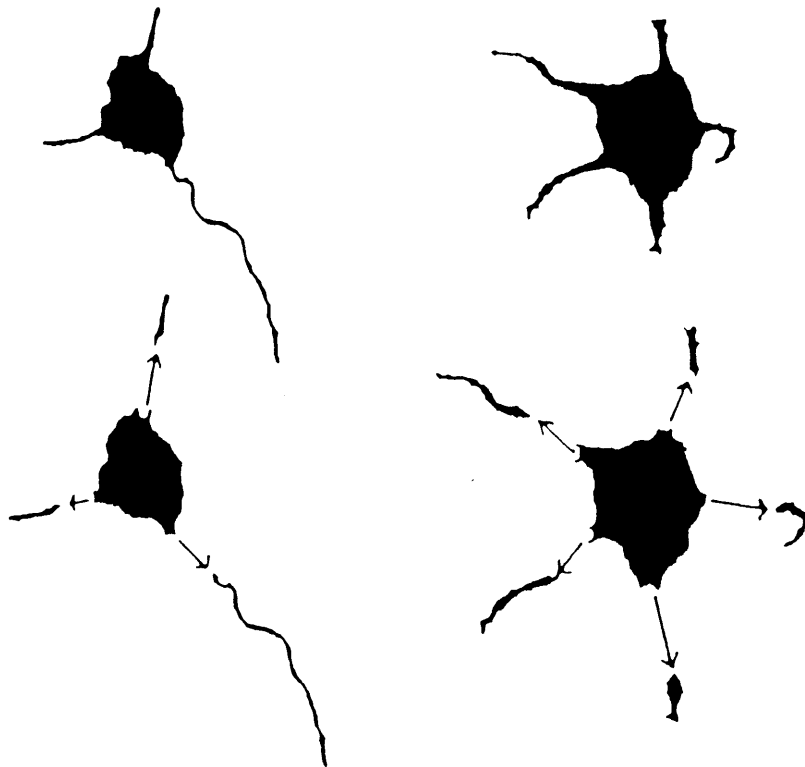


図3-7 図上の2つの細胞像の細胞体と主樹状突起を分離表示した例

3. 5 細胞像保存を目的とした2値画像の記述方法

画像処理により抽出した細胞像を含む画面は2値で表現されている。従って、ここでは、2値画像をデータ圧縮し少ない容量で記憶するための記述方法について述べる。

3. 5. 1 ビットパターン法

2値画像において、対象物上を1、背景が0の画素値を持つとすれば、各画素は1ビットで表現できる。ビットパターン法は1語32ビットとして各ビットに各画素の値を割り付けて1

語で32画素の情報を表現するコード化手法である。このコード化手法はコード化および2値画像再生のアルゴリズムが簡略で処理速度が早い。従って、本研究における画像認識システムでは、各種処理途中で得られる作業用の2値画像の仮の保存にこのコード化手法を用いた。

3. 5. 2 ランレングス法

次に、細胞画像のように対象物が画面の一箇所に連続領域として集中して存在する場合におけるデータ圧縮を目的とする2値画像の記述方法について述べる。

これは、ランレングス法の改良手法である。まず、画面を左上から走査し、対象物上の画素に出会えば、その画素の x 、 y 座標値を記述する。次に、その画素に引き続く、対象物上の画素数を記述する。同じ行に、離れて対象物上の画素があれば、その x 座標値および引き続く対象物上の画素数を記述する。行が替わる直前の画素数は負数で記述する。次行では、走査線が対象物と出会う位置は、その x 座標のみ記述する。対象物上の画素が存在しない行には、0を記述する。

図3-8は、ランレングス法による記述例で、対象物を1、背景を空白で表した2値画像とされている。この手法は、以下に述べる輪郭線のコード化手法と異なり画面内の対象物に囲まれた背景のホールが保存される。従って、本研究における画像認識システムでは、樹状突起の枝分かれが複雑で、突起の交わりを含むような画像データの保存のためにこのランレングス法を用いた。

Run length method

| | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | X_5 | X_6 | X_7 | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| Y_1 | | | | | | | | |
| Y_2 | | 1 | 1 | | 1 | 1 | | |
| Y_3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| Y_4 | | | 1 | 1 | 1 | | | |
| Y_5 | | | | | | | | |
| Y_6 | | 1 | 1 | 1 | | 1 | | |
| Y_7 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | |

| | | | | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Description format | | | | | | | |
| Y_2 | X_2 | 2 | X_5 | -2 | X_1 | -6 | X_3 |
| -3 | 0 | X_2 | 3 | X_6 | -1 | X_3 | -4 |

1-object space-background

図3-8 ランレングス法によるコード化の例。図上部の格子内の1は対象物、空白は背景を表す2値画像であり、ランレングス法によるコード化例を description format として示す

3. 6 細胞像保存を目的とした輪郭線の記述方法

3. 6. 1 チェインコード法

輪郭線の記述方法の一つであるチェインコード法について述べる。輪郭線は、2値画像の対象物上の画素で、かつ、その4近傍に少なくとも一つの背景上の画素を持つものによって構成される。このコード化法は、輪郭線の始点の座標と追跡方向で記述する。画素単位の追跡方向は、図3-9に示す8方向のいずれかであるため、画素単位で、8つのコードの中の1つを対応させる⁽⁹⁾。図3-9の例で示すように、輪郭線が一筆書きできなくとも記述可能とするため、0～7の8方向の方向コードの他に、追跡の終端を示すコード-1を加え、また、複数個の始点の座標値の記述が可能である。

ここで、輪郭線像から、輪郭線で囲まれる部分を塗り潰した2値画像を再生する方法について述べる。この時、画面の端には輪郭線上の画素が無いものとする。まず、画面の4辺から輪郭線に到達するまで画面を走査し、走査した画面に背景としての値を割り付ける。次に、輪郭線と、既に背景とみなされた領域で囲まれた部分を、領域拡張の手法により背景とする。以上の二つの操作を用いて、画面を背景と対象物に分割することができる。

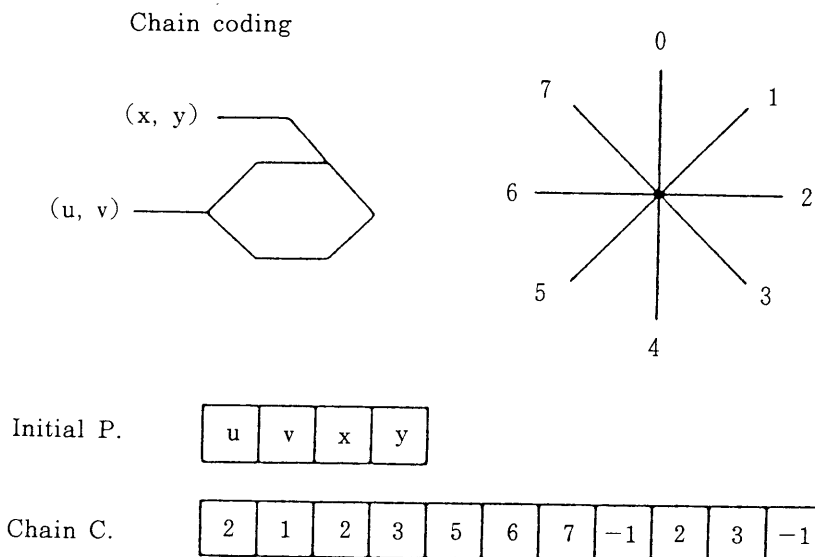


図3-9 チェインコードによる輪郭線の記述方法の例。図上左を右に記述した0～7の8方向の方向コードにより記述した例を示す。-1は、追跡の終端を表すコードである。

3. 6. 2 輪郭線の極座標表示

細胞体のように重心からの半径が輪郭線と1点のみで交わる画像に関しては、データ圧縮を行い、さらに回転、移動および、大小に関して不変となるように、細胞体の重心から輪郭線までの距離と角度を求め、極座標表示による1次元データの系列を作成する。重心からの半径が輪郭線と一箇所のみで交われば、その図形は、1次元データに変換できることは、Kashapらにより確かめられている⁽⁸⁷⁾。

極座標展開とは、はじめに、(3-1)式を用い、重心を求める。

$$G_x = \sum_{i=1}^N x(i) s(i) / S, \quad G_y = \sum_{i=1}^N y(i) s(i) / S \quad (3-1)$$

ここに、 G_x 、 G_y は重心の x 座標 y 座標を表し、 S は対象物の面積、 $s(i)$ は対象物を微小区間に分割したときの i 番目の面積、 $x(i)$ 、 $y(i)$ は i 番目の微小区間の x 座標および y 座標である。重心を求めた後、細胞体の輪郭線を追跡しながら、重心から輪郭線までの距離と角度を調べる。

図3-10に、細胞体を極座標表示した例を示す。

3. 6. 3 細胞画像の輪郭線の2次元データ系列による表現

重心からの半径が、輪郭線と一点のみで交わる図形は、1次元のデータ系列で表現でき、その他の図形も含めたものは、2次元データ系列で完全に表現できる。本研究において対象とする細胞体には1次元のデータ系列で表現できる凸体の形が多いが、一般に凸、凹部を持つ樹状突起を含んだ細胞像等に関しては、1次元系列の表現では不十分である。

そこで、細胞の輪郭線の2次元のデータ系列への変換を試みた。二つの系列データは、輪郭線追跡中の、追跡の始点からの距離と輪郭線の x 座標値、および、追跡の距離と輪郭線の y 座標値で構成した。図3-11の(a)に一つの細胞画像を、(b)に(a)を二つの系列データで表現した例を示す。

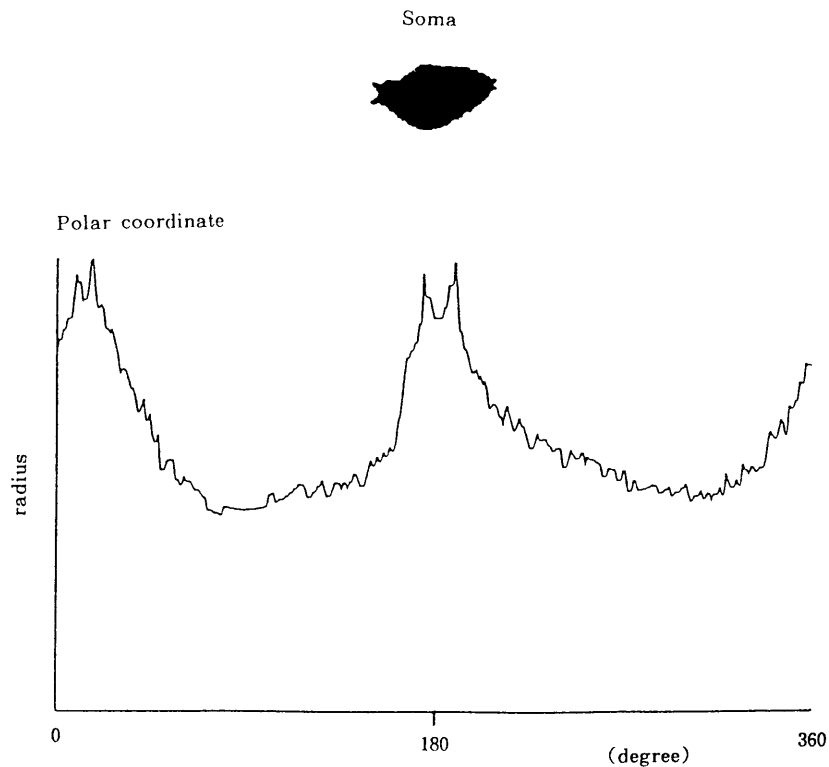


図3-10 図上の細胞体の重心から輪郭線までの距離を 1° 間隔で求め極座標表示した例

3. 6. 4 輪郭線データの代数的関係による特徴づけ

極座標表示した細胞体画像データについて代数的方法による特徴付けを行う。2次元ユークリッド空間の図形の重心から見た重心以外の2つの点を結ぶ直線は、極座標展開により次のように展開される。いま1次元データにおいて重心からの距離 r_1 、角度 θ_1 なる点 $A1(r_1, \theta_1)$ 、および他の点 $A2(r_2, \theta_2)$ を結ぶ直線は、2次元ユークリッド空間では次のように表現される。

$$\begin{aligned} r_1 \sin \theta_1 &= ar_1 \cos \theta_1 + b \\ r_2 \sin \theta_2 &= ar_2 \cos \theta_2 + b \end{aligned} \quad (3-2)$$

ここに a と b は定数である。(3-2)式より a 、 b は次のようになる。

$$\begin{aligned} a &= (r_1 \sin \theta_1 - r_2 \sin \theta_2) / (r_1 \cos \theta_1 - r_2 \cos \theta_2) \\ b &= (r_1 r_2 \sin(\theta_1 - \theta_2)) / (r_1 \cos \theta_1 - r_2 \cos \theta_2) \end{aligned} \quad (3-3)$$

2つの点 $A1$ および $A2$ を結ぶ直線上の任意の点 $A(r, \theta)$ は次式を満足する。

$$r(\sin \theta - a \cos \theta) = b \quad (3-4)$$

さらに2次元空間の2つの直線の交点を極座標の1次元データの点 (r', θ') とおくと、この点の微分値の連続性は成立しない。すなわち正数 ϵ 、 $\delta > 0$ に対し

$$|\theta - \theta'| < \delta \text{ のとき } |dr/d\theta - dr'/d\theta'| < \epsilon \quad (3-5)$$

を満足しない。いま極座標展開の1次元データが連続している時、直交座標系での図形が三角

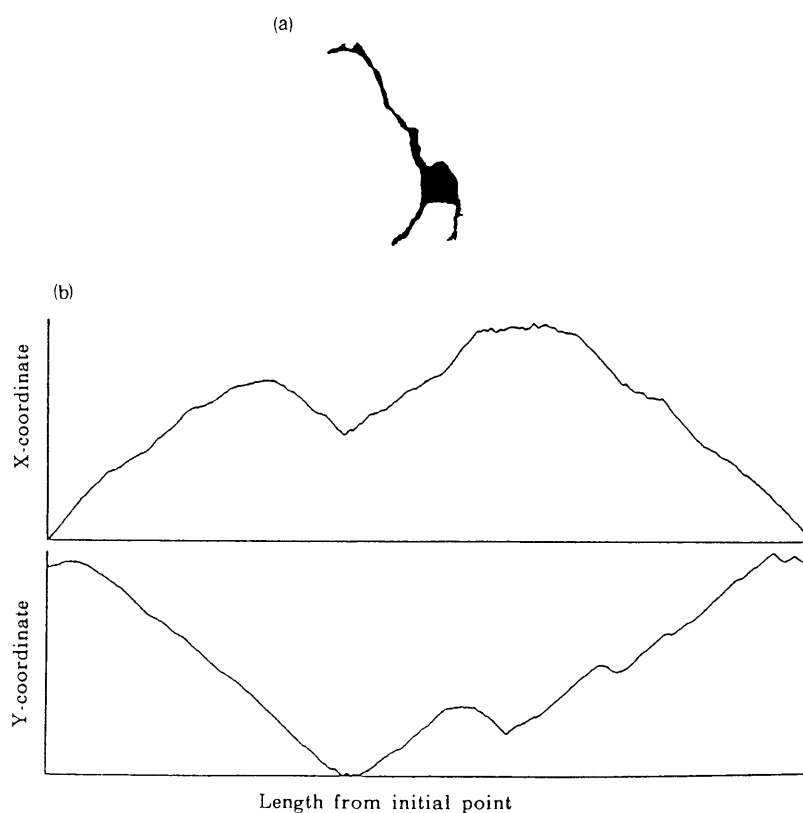


図3-11 (a) 細胞の二値画像と (b)(a)を輪郭線追跡の距離と輪郭線の x 座標値および y 座標値の2次元系列で表現した例

形であるための必要十分条件は、そのデータ上、微分値 $dr/d\theta$ の不連続点が3個あり、隣合う点 $A1(r_1, \theta_1)$, $A2(r_2, \theta_2)$ と、その間の任意の点 $A(r, \theta)$ が、(3-4)式に従うことである。

このことは、三角形が重心からみて3個の直線区間によって構成されるので各直線は(3-4)式の関係にあることで証明できる。さらに、三角形の辺の交点は3個あり、各々の交点が極座標による1次元データ上で、その点の微分値が不連続となることから明らかである。

次に、極座標展開による1次元データ上で、四角形であるための必要十分条件は、微分値 $dr/d\theta$ の不連続点が4個あり、かつ、この隣合う不連続点 $A1(r_1, \theta_1)$, $A2(r_2, \theta_2)$ と、その間の任意の点 $A(r, \theta)$ が(3-4)式に従うことである。同様に平行四辺形であるための必要十分条件は上記の四角形の条件に加えて、ひとつおきの不連続点区間の1次元データの線積分値が等しいことである。

同様に、楕円においては、微分値の不連続点は存在せず、長軸と短軸の各々に対応して、1次元データ上には極大値と極小値とが交互に2個ずつ存在する。従って、1次元データ上で楕円であるための必要十分条件は極大値と極小値が交互に計4個存在し、隣合う極値の点の間の線積分値が4区間とも等しくかつ、この極大値の点 $A1(r_1, \theta_1)$, 極小値の点 $A2(r_2, \theta_2)$ と、これらの点の間の任意の点 $A(r, \theta)$ は次式を満足することである。

$$r^2(\cos^2\theta/r_1^2 + \sin^2\theta/r_2^2) = 1 \quad (3-6)$$

(3-4)式と(3-6)式を比較すると、(3-6)式の r については、

$$r > b/(\sin\theta - a \cos\theta) \quad (3-7)$$

となることが容易にわかる。

さらに紡錘形であるための必要十分条件は、2つの極小値と2つの微分値 $dr/d\theta$ の不連続点が交互に存在し、各区間で(3-7)式を満足することである。

円であるための必要十分条件は、1次元データ上の任意の点の r の値が一定であることである。半円およびそれに近い形の条件として、1次元データ上、微分値 $dr/d\theta$ の不連続点が2個と極小値が1個存在し、不連続点間の任意の点は(3-4)式を満足し、不連続点と極小値の点との間の任意の点は(3-7)式を満足する形として特徴づけることができる。

以上のように細胞体図形の基本的な形の表現として1次元データ上の微分値の不連続点、直線性および極大値、極小値によって特徴づけられることを示した。

ユークリッド空間の2次元データ $x(\theta)$, $y(\theta)$ として展開した場合の特徴づけを上述の極座標展開の1次元データと関連づけると、まず次式が成立する。

$$dr/d\theta = (\partial r/\partial x)(dx/d\theta) + (\partial r/\partial y)(dy/d\theta) \quad (3-8)$$

ここで、 $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ より

$$\partial r/\partial x = x/(x^2 + y^2)^{1/2} = \cos \theta$$

$$\partial r/\partial y = y/(x^2 + y^2)^{1/2} = \sin \theta \quad (3-9)$$

従って、微分値 $dr/d\theta$ の不連続性は、(3-9)式が連続であることから $dx/d\theta$ あるいは、 $dy/d\theta$

の不連続性として証明できる.

$$|dr/d\theta - dr'/d\theta'| \leq |(\partial r/\partial x)(dx/d\theta) - (\partial r'/\partial x')(dx'/d\theta')| + |(\partial x/\partial y)(dy/d\theta) - (\partial x'/\partial y')(dy'/d\theta')| \quad (3-10)$$

ここで, $x \simeq x'$, $y \simeq y'$ の近傍を考える. (3-10) 式の右辺は, $C_x = \partial r'/\partial x'$, $C_y = \partial r'/\partial y'$ として

$$C_x |dx/d\theta - dx'/d\theta'| + C_y |dy/d\theta - dy'/d\theta'| \quad (3-11)$$

となる. これより, $dx/d\theta$ と $dy/d\theta$ が連続ならば, $\varepsilon_x, \delta_x > 0$, $\varepsilon_y, \delta_y > 0$ が存在し

$$\text{Max } \{\delta_x, \delta_y\} = \delta_{\text{total}} \quad (3-12)$$

$$(3-11) \text{ 式} < \varepsilon_{\text{total}} = \text{Max } \{\varepsilon_x, \varepsilon_y\} \quad (3-13)$$

となる δ_{total} , $\varepsilon_{\text{total}}$ が存在し, (3-10) 式の左辺は連続となる. ここで, $\text{Max } \{a, b\}$ は, a , b の小さくない方を意味する. 同様に, (3-10) 式の左辺が不連続ならば, 右辺のいずれか, あるいは, 両方が不連続となることが証明できる.

同様に, 1次元データの極値, $dr/d\theta = 0$ について考える. (3-8) 式において,

$$\partial r/\partial x = \cos \theta, \quad \partial r/\partial y = \sin \theta \text{ より}$$

$$\cos \theta (dx/d\theta) + \sin \theta (dy/d\theta) = 0 \quad (3-14)$$

(3-14) 式で, $dy/dx \neq -1/\tan \theta$ のときは, $dx/d\theta \neq 0$, $dy/d\theta \neq 0$ でも, $dr/d\theta = 0$ となる. また, $\cos \theta = \sin \theta = 0$ となることはないので, $dr/d\theta = 0$ であれば, $dy/dx \neq -1/\tan \theta$ のとき, $dx/d\theta = 0$ あるいは $dy/d\theta = 0$ である. 即ち, 1次元データ上での極値は, $dx/d\theta = 0$ または, $dy/d\theta = 0$ より 2次元データ上でも保存される. 以上のように 1次元データの微分の不連続点, 直線性, 極値が 2次元データにも保存され, 同じような特徴づけが可能となる. これらの細胞体図形の代数的特徴を用いた分類を行う場合には, 図形の許可範囲を設定する必要が出てくる. この問題は残されているが, 上述までの特徴づけは, 1次元, 2次元データの処理に有効である.

3. 7 データ圧縮を目的とした輪郭線近似法による細胞像形態の記述

本節では, 細胞体の形態の簡単化のための手法として, 輪郭線近似法を適用し, 原画像の特徴量と近似図形の特徴量との比較を行い, データ圧縮を目的として細胞体像の近似図形を用いた形態解析を行うことの妥当性について述べる. また, データ圧縮率, および, 原画像を用いた形態分類と近似図形による分類結果の比較の方法について考察し, 新しい定量的な評価方法を提案して細胞体に適用した結果について述べる.

3. 7. 1 輪郭線近似のアルゴリズム

画像の輪郭線の近似手法には, 多角形近似, スプライン関数, フーリエ記述子を用いた近似等, さまざまな手法がある^{(88),(89)}. 本研究では, データ圧縮, 解析の処理時間短縮を目的として, 細胞体の輪郭線を, 最大多角形法⁽⁹⁰⁾, 最小2乗法と, フーリエ記述子⁽⁹¹⁾による方法の3

手法を用いて近似し比較検討した。以下にこれら三つの近似方法のアルゴリズムについて述べる。

(1) 最大多角形法

最大多角形法は、輪郭線上の点をすべて含む多角形、すなわち輪郭線の外接多角形の中で最小のものを求める手法で、次の手順による。

(1-1) 細胞体の輪郭線を追跡しながら、輪郭線上の点を、 x 座標、 y 座標上の点として順に、 $P(i) (x_p(i), y_p(i)) (i=1, 2, \dots, N)$ とする。ここに N は輪郭線を構成する点の個数である。

(1-2) $\{P(i)\}$ に関して重心 $G (g(x), g(y))$ を座標の原点とするように座標変換を行う。すると、 i 番目の点の新座標は、 $(X(i), Y(i)) (i=1, 2, \dots, N)$ となる。

$$\begin{aligned} X(i) &= x_p(i) - g(x) \\ Y(i) &= y_p(i) - g(y) \end{aligned} \quad (3-15)$$

(1-3) すべての連続する3点の列 $(X(i), Y(i)), ((X(i+1), Y(i+1)), (X(i+2), Y(i+2)))$ について

$$F = \{X(i+1) - X(i)\} \{Y(i+2) - Y(i)\} - \{X(i+2) - X(i)\} \{Y(i+1) - Y(i)\} \quad (3-16)$$

を計算する。その結果、

$F < 0$ のとき $(X(i+1), Y(i+1))$ を削除し、 $i = i + 2$ とし、

$F \geq 0$ のとき $i = i + 1$

とする。 $i, i+1, i+2$ のいずれかが N になったら、 $i = 1$ とし、 N からいま削除した点の数を引き N' にセットして、 $i = 1$ から N' までのすべてに関して $F \geq 0$ になったら処理を終了する。 $F < 0$ のときは (1-3) の処理を繰り返す。

(1-4) 残っている点の個数を M とし、残っている点を $(AX(i), AY(i)) (i=1, 2, \dots, M)$ とする。 $(AX(i), AY(i))$ を順に結ぶことにより、原画像の輪郭線を完全に包含する凸多角形である近似図形が得られる。

(2) 最小2乗法

最小2乗法は、輪郭線上の点を隣接点との方向変化が小さいもの同士でグループ分けし、各グループの点に最小2乗法で線分を当てはめ、その線分によって囲まれる図形を近似多角形とする手法である。その手順は、次のとおりである。

(2-1) 細胞体の輪郭線を追跡しながら、輪郭線上の点を順に、 $P(i) (x_p(i), y_p(i)) (i=1, 2, \dots, N)$ として

$$\begin{aligned} IXX(i) &= x_p(i+1) - x_p(i) \\ IYY(i) &= y_p(i+1) - y_p(i) \end{aligned} \quad (3-17)$$

を計算する。

(2-2) $IXX(i), IYY(i)$ の値を $i = 1$ から順に調べ、初めて $IXX(i), IYY(i)$ がそれぞれ、ゼロ

以外の値をとったら、その値を ISX, ISY に記憶しておく。

(2-3) 下式に示す F_x, F_y のいずれかが負の値をとるまで計算を続ける。

$$\begin{aligned} F_x &= IXX(i) \times ISX \\ F_y &= IYY(i) \times ISY \quad (i=1, 2, \dots, N) \end{aligned} \quad (3-18)$$

F_x, F_y のいずれかが負となったときの i を M とする。

(2-4) $P(i)$ ($i=1, 2, \dots, M$) に対して最小2乗法で直線回帰を行う。得られた回帰直線を $m(1)$ とする。(2-3) で負となった ISX, ISY の符号を反転する。

(2-5) (2-3), (2-4) の操作を ($i=M, \dots, N$) について繰り返し、(2-4) で得られた回帰直線を順に $m(k)$ ($k=2, 3, \dots$) とする。

すべての輪郭線上の点が、いずれかの直線で近似されたら処理を終了する。

(2-6) (2-5) までで得られた直線 $m(i)$ ($i=1, 2, \dots, NN$) について、 $m(i)$ と $m(i+1)$ の交点を $C(i)$ ($i=1, 2, \dots, NN-1$) とし $m(NN)$ と $m(1)$ の交点を $C(NN)$ とする。このとき、 $C(i)$ ($i=1, 2, \dots, NN$) を頂点とする多角形が得られた近似図形である。

(3) フーリエ記述子

フーリエ記述子には、1点からの角度変化の総和である全曲率関数をフーリエ展開したZ形記述子⁽⁹²⁾、閉曲線上の1点からの長さをフーリエ展開したG形記述子⁽⁹³⁾等がある。本研究では、細胞体だけでなく主樹状突起まで含めた形態近似への発展を考慮に入れ、開曲線の近似に適用できるP形記述子⁽⁹¹⁾を用いて輪郭線を近似した。P形記述子は、全曲率関数を指数部としてもつ指数関数をフーリエ変換したもので、この第 M 次までを逆変換することにより近似曲線が得られる。

(3-1) 輪郭線上の点を $(x(i), y(i))$ ($i=1, 2, \dots, N$) とし、複素数 $Z(i)$ を考える。

$$Z(i) = x(i) + jy(i) \quad (3-19)$$

但し、 j は虚数単位とする。

(3-2) $\omega(i) = (Z(i+1) - Z(i)) / \delta$ を求める。

$$\text{但し, } \delta = |Z(i) - Z(i+1)| \quad (i=1, 2, \dots, N) \quad (3-20)$$

$$(3-3) \quad c(k) = (1/N) \sum_{i=0}^{N-1} \omega(i) \exp(-j2\pi ik/N) \quad (3-21)$$

を計算する。

$$(3-4) \quad \hat{c}(k) = \begin{cases} c(k) : k=0, 1, \dots, N/2 \\ c(N+k) : k=-N/2+1, \dots, -1 \end{cases} \quad (3-22)$$

とすると

$$\omega_M(i) = \sum_{k=-M}^M \hat{c}(k) \exp(j2\pi ik/N) \quad (3-23)$$

ω_M は $\hat{c}(k)$ の第 M 次までを逆変換したものである。

$$(3-5) \quad Z_M(i) = Z_M(0) + \delta \sum_{r=1}^{i-1} \omega_M(r) \quad (3-24)$$

を計算する。 $Z_M(i)$ が細胞体の輪郭線の近似曲線である。

3. 7. 2 3 近似手法によるシミュレーション図形と細胞像形態の近似例

図3-12(a)は、三角形、円、紡錘形を計算機で作成した図形で、これを(b)最大多角形法、(c)最小2乗法、(d)フーリエ記述子(次数5)の3手法で近似した結果である。図3-13は、図3-12の図形のいくつかの特徴量を原画像と近似図形に関して求め各軸上にプロットしたものである。(a)は三角形、(b)は円、(c)は紡錘形の特徴量を表す。すべて凸図形であるため最大多角形法においては、近似がなされていないことがわかる。また、最小2乗法に関しては、三角形は、近似されない。さらに、円や紡錘形の曲線部分のように隣接点と大きい角度変化がない場合、この手法では近似できないが、角度変化の他に近似曲線と輪郭線の距離の閾値も含めたため、図のような近似図形が得られた。このシミュレーション図形に関しては、原画像と形態が異なっている。フーリエ記述子による近似は、曲線近似であるため、円は、完全に再現できる。また、偏角より得られる関数のフーリエ変換の低周波部分を用いているため三角形、紡錘形の角の部分が丸くなっている。

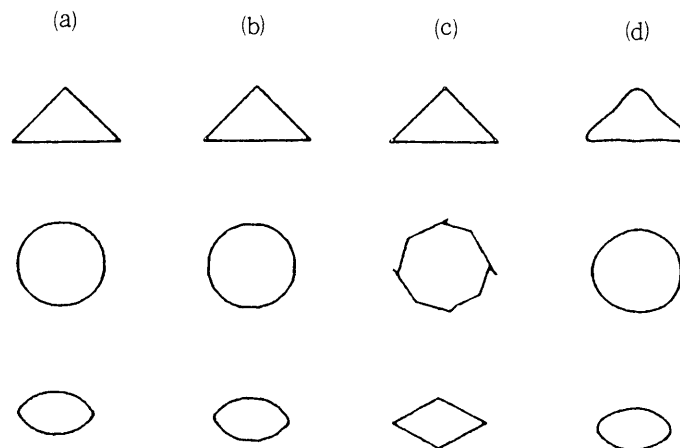


図3-12 シミュレーション図形を用いた各近似手法の評価

(a) 原画像 (b) (a) を最大多角形法で (c) (a) を最小2乗法で (d) (a) をフーリエ記述子を用いた近似手法で各々近似した結果

図3-14は、3個の細胞体に関して(a)の原画像を、(b)が最大多角形法、(c)が最小2乗法、(d)がフーリエ記述子(次数10)により近似した結果である。実際の細胞体に関しては(b)と(d)において形態がかなり簡単化されていることがわかる。また、最大多角形法では、凹の部分失われるため、形態が原画像とやや異なっている。フーリエ記述子による近似図形は、曲線の大きい変動を保存し、また、細胞体の形態が丸みを帯びているため、視覚的には、良く近似されている。最小2乗法による近似図形は、原画像の特徴をよく保存している。しかし、隣合う近似曲線が平行に近い場合、近似図形と原画像の輪郭線の形状がはなはだしく異なる。このような例では、近似図形の周囲長が原画像の周囲長よりかなり長くなる。従って、以後の

第3章 画像処理による細胞像データの収集と保存およびデータ圧縮

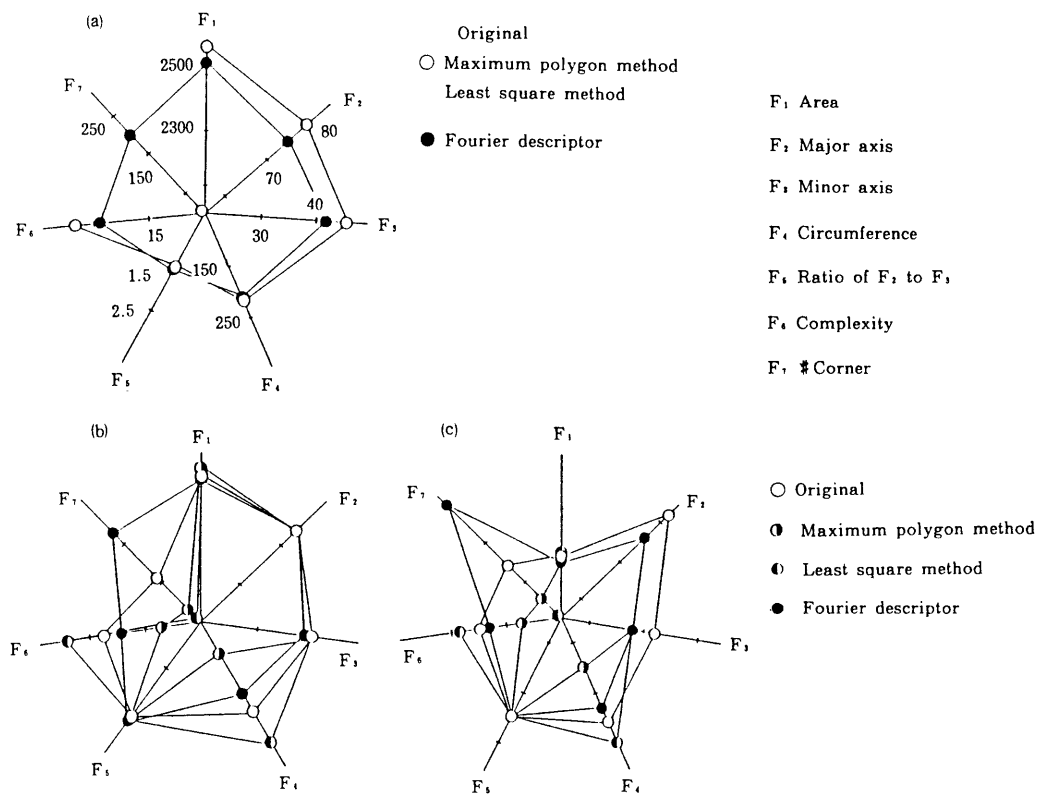


図3-13 シミュレーション図形に各近似法を適用した近似図形の特徴量の比較

(a) 三角形 (b) 円 (c) 紡錘形に関する、面積(F_1)、長径(F_2)、短径(F_3)、周囲長(F_4)、長径/短径(F_5)、複雑さ(F_6)、角の数(F_7)で、○印が原画像、◐印が最大多角形法、◑印が最小2乗法、●印がフーリエ記述子を表す

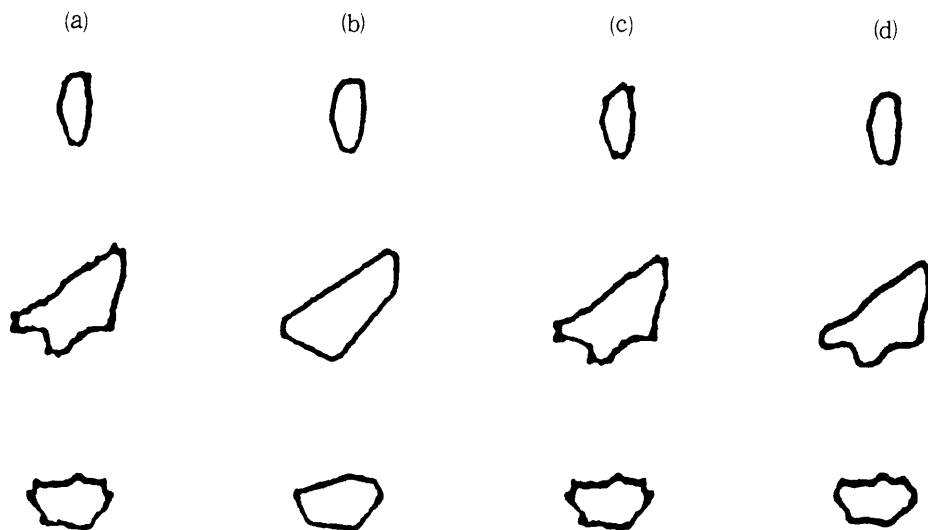


図3-14 3近似手法による細胞体画像の近似例

(a) 原画像 (b) 最大多角形法 (c) 最小2乗法 (d) フーリエ記述子

解析においては、近似図形の周囲長が、原画像の周囲長の1.2倍を超えたら解析の対象から除去して行った。

3. 7. 3 細胞画像とその近似図形の特微量の比較

細胞体の輪郭線を近似した目的は、保存のためのデータ圧縮を行うことと、形態解析処理の簡単化のためである。形態解析に近似図形を用いる場合、原画像が持つ特微量と近似図形の特微量とが一致している必要がある。そこで、ナマズの網膜細胞の光学顕微鏡による原画像と、近似図形からいくつかの形態的な特微量を抽出して比較した結果について述べる。

細胞体の原画像および3. 7. 1で述べた3手法により得られた近似図形の各々から、面積、長径、短径、周囲長、頂点の数、形態の細長さを表す長径/短径、形態の複雑さを表す周囲長²/面積、の合計7つの形態的な特微量を計算した。これらの特微量を用いて、近似図形に関して評価を行った結果を述べる。

ナマズの150個の網膜細胞体像とその近似図形とについて上述の特微量を計算し、その平均値と標準偏差を示したのが表3-1である。頂点の数は、原画像と比較して、多角形近似の図形ではかなり小さく、データ圧縮がなされていることがわかる。フーリエ記述子に関しては、形態が滑らかになるため、頂点の数は多くなるが、今回の処理では、次数10までの再生図形を用いており、データ圧縮はなされている。面積、長径、短径、長径/短径に関しては、平均値、標準偏差ともに近似図形においては、原画像の特徴をかなり保存している。周囲長は、最小2乗法による近似図形に関しては原画像の値を保存しているが、最大多角形法とフーリエ記述子による近似図形は形態が簡単化され、輪郭線の細かい変動が失われるため、周囲長が短く

表3-1 150個のナマズ網膜の細胞像とその近似図形の形態の特微量の平均値と標準偏差

| 特微量 \ 近似法 | | 原 画 像 | 最 大 多角形法 | 最 小 2 乗 法 | フーリエ 記 述 子 |
|-------------------------|------|--------|-------------|--------------|---------------|
| 面 積 (μm^2) | 平 均 | 162.10 | 175.60 | 164.30 | 158.00 |
| | 標準偏差 | 77.02 | 85.76 | 77.79 | 75.64 |
| 長 径 (μm) | 平 均 | 18.66 | 19.26 | 18.85 | 18.19 |
| | 標準偏差 | 4.70 | 4.81 | 4.68 | 4.51 |
| 短 径 (μm) | 平 均 | 10.87 | 11.67 | 10.97 | 10.37 |
| | 標準偏差 | 2.27 | 2.45 | 2.28 | 2.36 |
| 周 囲 長 (μm) | 平 均 | 65.49 | 49.66 | 61.36 | 48.7 |
| | 標準偏差 | 16.29 | 11.8 | 14.86 | 11.52 |
| 長径/短径 | 平 均 | 1.74 | 1.67 | 1.74 | 1.79 |
| | 標準偏差 | 0.37 | 0.39 | 0.38 | 0.40 |
| 周囲長 ² /面積 | 平 均 | 27.35 | 14.56 | 23.81 | 15.57 |
| | 標準偏差 | 4.17 | 1.49 | 4.27 | 1.84 |
| 頂点の数 | 平 均 | 102.75 | 13.41 | 38.15 | 138.27 |
| | 標準偏差 | 24.84 | 2.24 | 11.13 | 35.03 |

なっている。

図3-15は、80個の細胞体とその近似図形から計測した(a)面積、(b)周囲長、(c)長径/短径、(d)周囲長²/面積についてのヒストグラムを示したものである。□が原画像、▤が最大多角形法、■が最小2乗法、⊠がフーリエ記述子による近似図形のヒストグラムを表す。形態解析に近似図形を用いるとき、各特徴量に対するヒストグラムの形状が等しいことが必要である。(a)、(c)においては、原画像と近似図形の各棒の高さが等しいことにより、面積、長径/短径に関しては、原画像と近似図形の特徴量に関する分布形状はよく類似している。特に、最小2乗法による近似図形の場合、原画像とほとんど同じ分布を示している。周囲長²/面積および周囲長は、形の簡単さを表すが、最大多角形法とフーリエ記述子による近似図形の分布が右に大きくずれているのは、形態が単純化されたことを表現している。

図3-16は、(a)面積、(b)長径/短径、(c)周囲長²/面積の3つの特徴量について、150個の細胞に関して、原画像の特徴が近似図形で保存されているか否かを解析するために描いた2次元ヒストグラムである。各図は、横軸が原画像、縦軸が左から最大多角形法、最小2乗法、フーリエ記述子(次数10)の各近似図形を表す。表3-2は、更に長径、短径、周囲長を加えた6つの特徴量の原画像と近似図形の相関係数を表す。面積と長径/短径については、ほとんど対角線上に分布し、個々の細胞体に関して特徴をよく保存していることがわかる。周囲長²/面積は、最大多角形法とフーリエ記述子による近似図形の場合、原画像の値より全体に小さく分布の形状も対角線からはずれている。

図3-17は、先に述べた7つの形態的な特徴量を原画像および3種類の近似図形から計算し、合計28例の特徴量を150個の細胞に関して主成分分析した結果である。主成分分析は、対象とする特徴量が、いかなる内潜因子で表現できるかを解析するもので、解析した28例の特徴量は主に2つの因子で表現できた。これらを因子1、因子2と名付け、各特徴量に占める因子1と因子2の重みを2次元座標(横軸が因子1、縦軸が因子2)にプロットしたものが図3-17である。座標上で互いに近傍にあるもの、あるいは図の下の方で同一の番号が付与された特徴量は、類似の意味付がなされると考えられる。図3-17では原画像と近似図形から得られた同じ特徴量は、頂点の数と周囲長²/面積を除き極く近傍に位置し、各特徴量は原画像から求めても近似図形から求めても意味づけは変化していないことがわかる。なお、頂点の数、周囲長²/面積については、前述のように原画像と近似図形において近傍にないことが望ましい状態である。

3. 7. 4 近似図形の形態分類への応用に関する検討

細胞画像データベースにおいては、形態に関する検索、分類が必要となる。そこで、ここでは、原画像を用いた分類結果と近似図形を用いたそれとの比較、検討の方法について提案、考察して150個の細胞体に適用する。

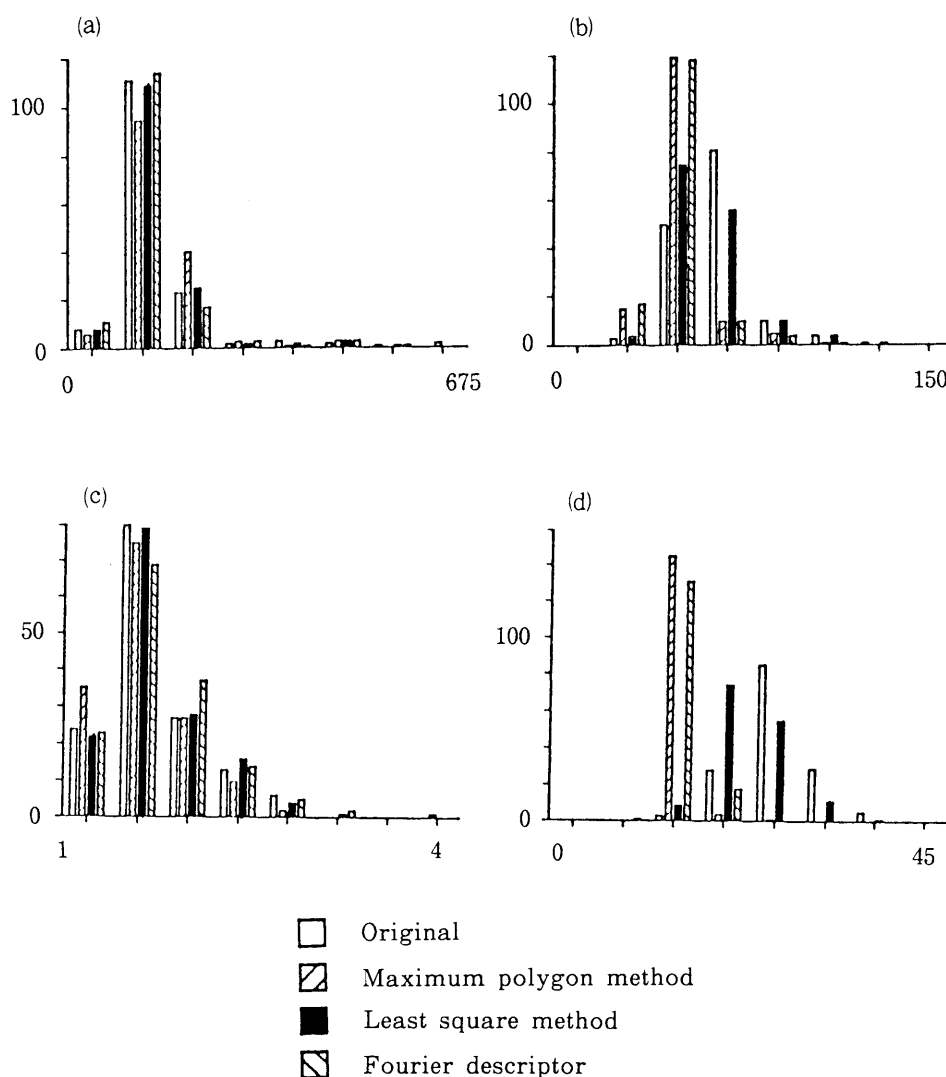


図3-15 80個のナマズ網膜の細胞像とその近似図形に関する

(a)面積, (b)周囲長, (c)長径/短径 (d)周囲長²/面積のヒストグラム

□原画像 ▨最大多角形法 ■最小2乗法 ▩フーリエ記述子を示す

図3-18は表3-1に示す特徴量のうち、頂点の数を除いた6つの特徴量による特徴量空間内のテンプレートの細胞体との距離の近いものから順に10個取り出し、左から並べたものである。近似図形ではテンプレートは、任意の細胞体像より選択したものであるから、テンプレート自身も比較する細胞体と同方法で近似図形とし、距離を比較した。特徴量に関しては、すべて、対象とする細胞像について平均値が0、標準偏差が1となるように正規化した。近似図形の細胞体の右上に*を示したものは、原画像のテンプレートマッチングにおいて、10個の内に含まれたものを表す。最小2乗法による近似図形を用いた分類結果は、原画像のそれと類似している。直観的にみると、原画像を用いた分類結果の方が近似図形を用いた場合よりやや優れているように思われる。しかし、定量的な評価ではない。

第3章 画像処理による細胞像データの収集と保存およびデータ圧縮

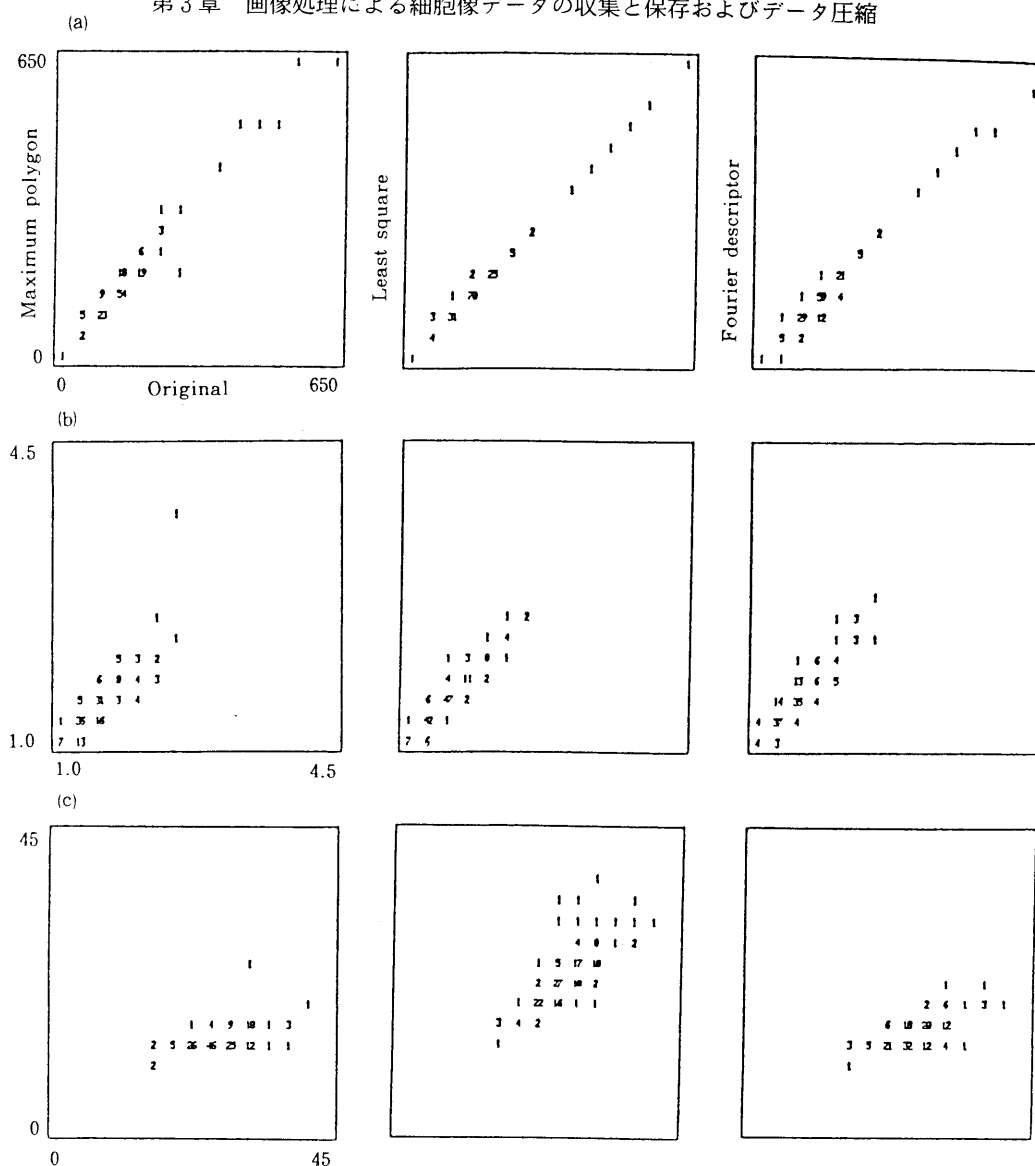
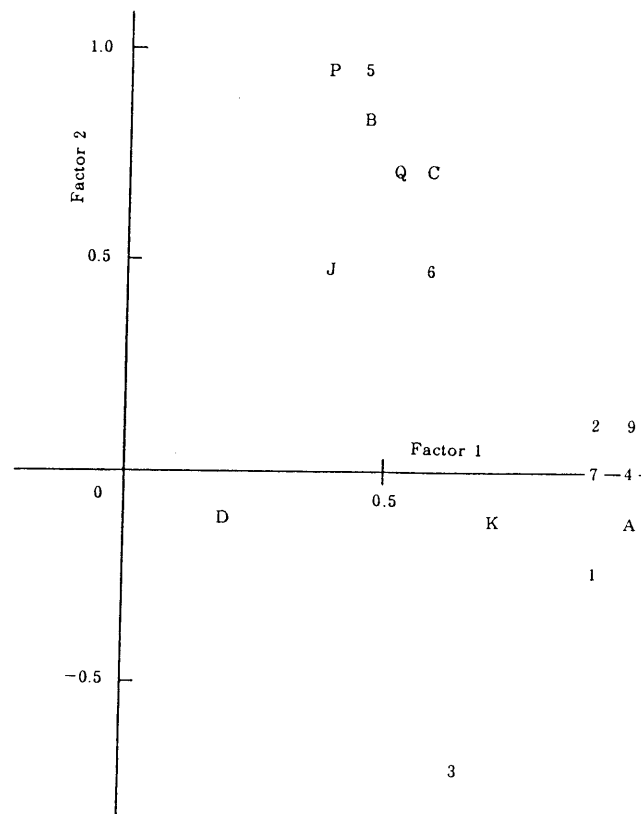


図3-16 150個のナマズ網膜の細胞体像を対象とした (a)面積 (b)長径/短径 (c)周囲長²/面積の
原画像に対する近似図形の特徴量の2次元ヒストグラム

(a) (b) (c) いずれも左から最大多角形法, 最小2乗法, フーリエ記述子による近似図形との比較

表3-2 150個のナマズ網膜の細胞体像とその近似図形の特徴量の相関係数

| 特徴量 \ 近似法 | 最大多角形法 | 最小2乗法 | フーリエ記述子 |
|----------------------|--------|-------|---------|
| 面積 | 0.986 | 0.999 | 0.997 |
| 長径 | 0.990 | 0.994 | 0.986 |
| 短径 | 0.917 | 0.989 | 0.962 |
| 周囲長 | 0.979 | 0.979 | 0.982 |
| 長径/短径 | 0.839 | 0.978 | 0.935 |
| 周囲長 ² /面積 | 0.523 | 0.797 | 0.762 |
| 頂点の数 | 0.152 | 0.825 | 0.953 |



| | Original | Maximum polygon | Least square | Fourier descriptor |
|------------------------------|----------|-----------------|--------------|--------------------|
| Area | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Major axis | 2 | 9 | 2 | 2 |
| Minor axis | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Circumference | 4 | A | 4 | 4 |
| Ratio of major to minor axis | 5 | B | 5 | P |
| Complexity | 6 | C | J | Q |
| # Corner | 7 | D | K | 4 |

図3-17 150個のナマズ網膜の細胞体像を対象に原画像と3種類の近似図形各々7個ずつ求めた特徴量の主成分分析の結果

そこで、原画像を用いた場合と近似図形を用いた場合の特徴量空間における距離を用いた形態分類の新しい定量的な評価法を提案する。すなわち、特徴量空間においてテンプレートとの距離を等間隔に分割し、各区間に含まれる特徴量の分布をもって評価すれば、形態分類の比較が定量化されることになる。図3-19は、この定量評価法を細胞体150個に適用した結果である。(a)は、6次元特徴量空間においてテンプレートとの距離を4等分し、各区間に含まれるデータ数をプロットしたものである。(b)は、各区間に含まれる細胞体のテンプレートとの距離の平均値と標準偏差、(c)は各区間の細胞体像の面積の平均値と標準偏差、(d)は、長径/短径の平均値（図中○印）と標準偏差（図中垂直方向の線分）をプロットしたものである。(b)～(d)はすべて、○が原画像、●が最大多角形法、●が最小2乗法、●がフーリエ記述子によ

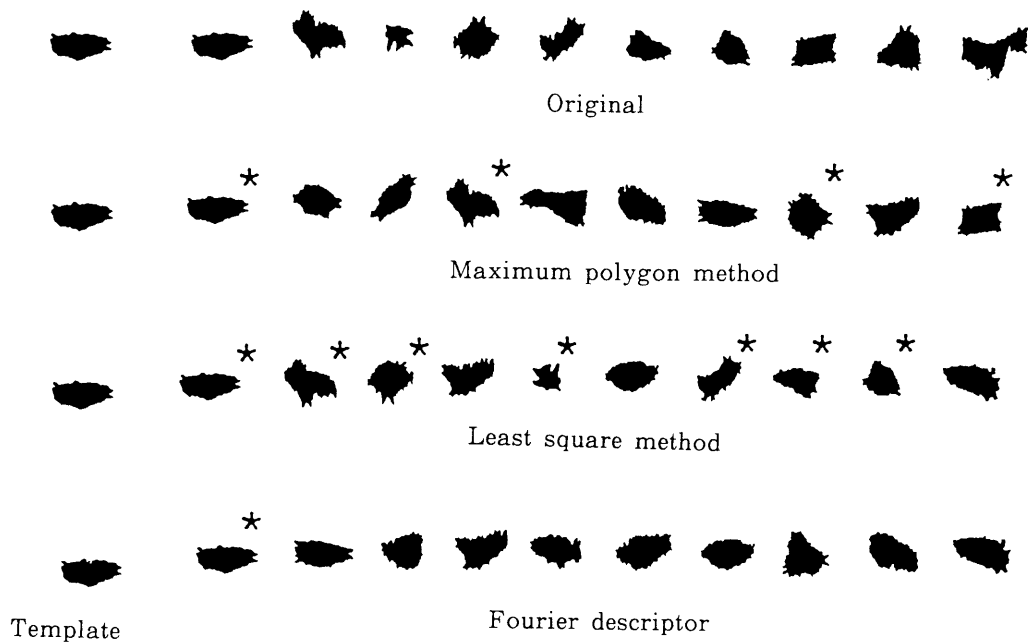


図3-18 150個のナマズ網膜細胞像と近似図形の面積、長径、短径、周囲長、長径／短径、周囲長²／面積の特徴量空間のユークリッド距離に基づくテンプレートマッチングの結果。左端がテンプレートで、最も類似度の高いものより10個を抽出している。分類結果は上から原画像、最大多角形法、最小2乗法、フーリエ記述子による近似図形に関するものを示す。

る近似図形の平均値を表す。座標内に引いた水平方向の直線は、テンプレートの原画像の特徴量を表す。(b)～(d)のいずれに関しても距離の近い細胞像の平均値は、原画像、近似図形共にテンプレートの値に近く、標準偏差も小さい。最大多角形法による近似図形は距離が小さくても平均値がテンプレートの値と少しく異なる傾向にあり、他のものより分類精度が劣ると考えられる。長径／短径は、全体に変動が小さいため、距離にかかわらず大きな変化はみられなかった。

3.8 むすび

本章では、細胞画像認識システムにおいて細胞像を保存するための画像処理による細胞像の収集・保存の際のデータ圧縮を考慮した細胞像の記述手法の検討結果を述べた。

処理対象とした細胞の光学顕微鏡像は、光学的なノイズ、顕微鏡の焦点ずれや染色むら等に起因するエッジのボケを含む。光学的なノイズに関しては、局所窓を用いたメディアンフィルタや分散値の大小で、ノイズかノイズでないかの判定を行い平滑化を行う非線形フィルタにより除去できた。エッジのボケ除去のため、焦点深度をわずかずつ変化させて標本化した画像を重ね合わせることで、重ね合わせた画像の5×5局所窓の分散値を計算し、大きい値を示すところをエッジの候補点とし、その点の近傍点との濃度差を拡大した。その画像に関し、局所的に2値化の閾値を変化させる動的閾値化手法を対話型で行うことにより正確な細胞画像の抽出

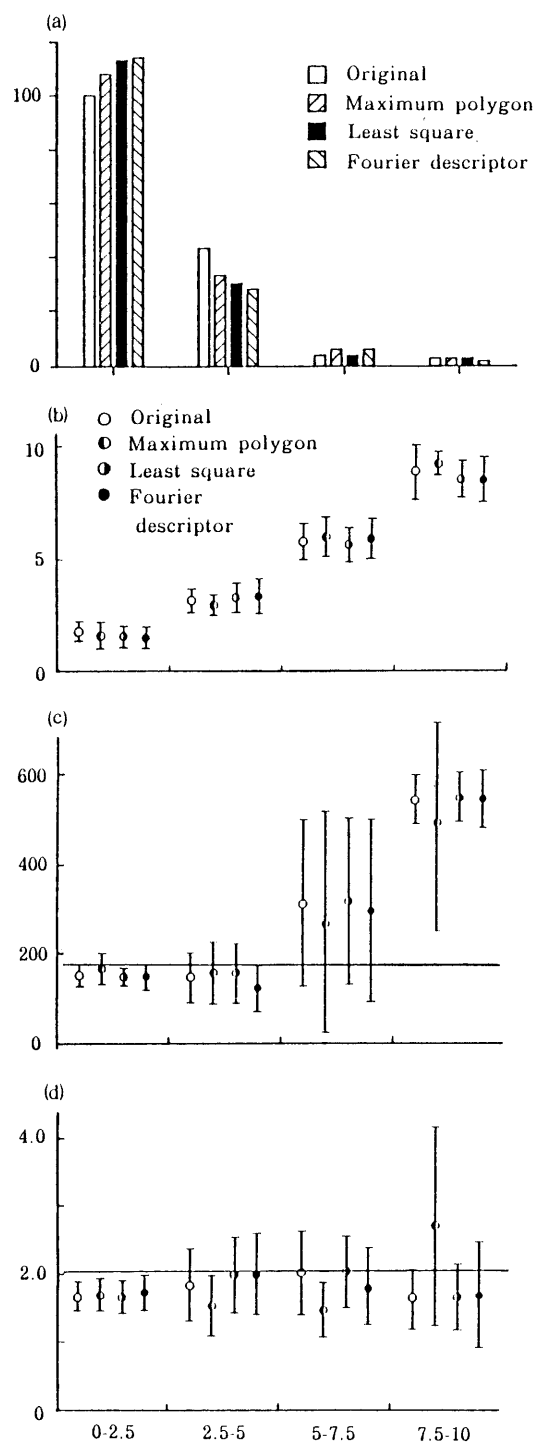


図3-19 近似図形を用いた形態分類結果の評価例

(a) テンプレートと原画像および近似図形との距離を4等分した際各区間に含まれるデータ数 (b) 各区間に含まれるデータとテンプレートとの距離の平均値と標準偏差 (c) 各区間に含まれるデータの面積および (d) 長径/短径の平均値と標準偏差. (b)-(d) は、○印が平均値、垂直方向の線分が標準偏差を表す

を行った。

抽出した細胞像は、細胞体と樹状突起を含む。ここでは、幅の狭いところを画像処理で除去する手法で細胞体から樹状突起の分離を行った。次に抽出した細胞像および細胞体像に関する2値画像の記述方法に関し、ビットパターン法とランレングス法を検討し、網膜細胞像の保存にはランレングス法がデータ圧縮率が優れているという結論を得た。

さらに、細胞像の輪郭線の記述方法に関して、チェーンコード法を応用した手法を提案した。細胞体のように対象物内にホールを持たない単純な図形に関しては、輪郭線画像から2値画像が再生できることが確かめられた。本研究の対象とした網膜細胞画像認識システムでは、複雑な樹状突起の枝分かれパターンを持たない大部分の細胞像および細胞体像をチェーンコード法で記述した。

細胞体像に関しては、その輪郭線の極座標表示あるいは全ての形が表現できる2次元データ系列による表現を試みた。これにより第5章で述べる形態の特徴抽出が容易に行え、また、データ圧縮が可能となる。極座標表示により1次元データ系列に関しては、シミュレーション図形を用いた代数的関係による特徴付けを行い細胞像への応用に対する基礎的検討を行った。

最後に、網膜細胞の形態解析のための画像データベースにおけるデータ圧縮と処理の簡単化を目的として、細胞体の輪郭線の近似を行い、150個のナマズの網膜細胞像に適用してその特徴量を比較検討した結果を述べた。そして、細胞の原画像に対する近似図形の評価方法について定量的に評価する方法につき提案を行った。その結果、最大多角形法とフーリエ記述子による近似図形は、データ圧縮に関して優れていることがわかった。最大多角形法は、原画像の特徴を少し変化させる傾向にあった。曲線近似法であるフーリエ記述子による近似図形は、細胞体のように丸みを帯びた図形には適しており、形態の特徴は、よく保存していた。また、フーリエ記述子による近似図形を用いた形態分類の結果は、ヒトが形態を分類するのと類似した結果となった。

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

4.1 はしがき

神経細胞は、中央部に膨らみのある細胞体とそこから細長く伸びる数本の樹状突起および軸索から構成される。特に、網膜細胞は平面形状を示し、その樹状突起は細胞体から比較的太い主樹状突起が伸び、それがしだいに複雑に枝分かれして大きく広がり、他の細胞から伸びる樹状突起と連結する。樹状突起および軸索は、感覚器官から受容された刺激や細胞内で情報処理された生体信号の細胞間および脳への伝達に関与している。従って、樹状突起の伸びる方向、連結関係等を解析することにより、感覚器官から細胞を介しそこで情報処理された信号が脳に伝達される経路を推測することが可能となる。また、ある細胞の樹状突起の分岐パターン、広がり大きさ等を計測することにより、その細胞のもつ機能、情報処理量の推定も可能となると考えられる。

従来より神経形態学の分野では、樹状突起の形状に関心がもたれ、顕微鏡のスケッチ画像から樹状突起の長さ、広がり面積、分岐点の位置、樹状突起の連結関係等の計測が行われてきた^{(94),(37),(95)}。特に、この分野で計算機が用いられるようになり、入力タブレット等で行う半自動化処理による細胞の樹状突起形状の詳細な計測が行われた^{(96),(97),(98),(99)}。しかし、多くの細胞に関して画像処理による自動化処理を行い、樹状突起の形状認識を行う試みは例をみない。

本章では、網膜細胞画像認識システムにおいて、網膜細胞の樹状突起パターンの形態解析を行うため、画像処理による樹状突起形状の特徴抽出法を検討した結果について述べる。

細胞の樹状突起は、細胞体と比較して幅が狭く、細胞体を起点とし分岐しながら長く伸びている。従って、その本数、分岐点の位置、長さ等の構造の特徴を抽出するためには、細胞画像を細線化し、その骨格線を求め、骨格線の構造を解析することが有効な手段である。神経形態学の分野では、樹状突起の形態解析に細線化手法を用いている例は少ない⁽¹⁰⁰⁾。樹状突起パターンの特徴を細胞像の骨格線から取り出すことが可能となれば、樹状突起の形態解析を、多数の細胞像を用い、計算機処理することが可能となり、従来までの形態の詳細解析では得られなかった知見が得られることが期待できる。

そこで4.2では、細胞像の長く伸びる樹状突起の方向、分岐点の位置等を保存した骨格線のみを抽出する目的で、従来から提案されている細線化の手法の改良手法を提案する。ところで、細線化手法に関しては、文字認識⁽⁵³⁾、医用画像診断^{(101),(86)}、自動図面読み取り⁽¹⁰²⁾、指紋のパターン認識⁽⁵⁶⁾等を対象として各種提案されており、それらの方法が、樹状突起の画像認識に対しても適用できると考えられるので、4.3.2においてシミュレーション図形による

細線化も含めて提案の方法と従来の細線化手法の比較、検討を行った。4.3.3では、この細線化手法を実際の細胞画像に適用した例について述べている。

次に、4.4では、樹状突起の形状認識を正確に行うため、細線化の前処理の方法、最適な前処理手法の選択法を検討した。細胞画像は、染色むらや顕微鏡の光学的精度の影響でエッジがぼけ、二値化すると輪郭線が滑らかでなくなる。そのため、これを細線化すると樹状突起以外の骨格線も抽出してしまう。これらの骨格線を除去するため、従来濃淡画像の雑音除去に用いられてきた局所窓を用いた平滑化の手法を二値画像に応用し、輪郭線の変動を除去した。その結果高い精度で樹状突起のみの骨格線が抽出できた。

4.2 樹状突起認識のための図形の細線化手法

樹状突起の特徴を抽出するため、細胞の二値画像のスケルトンを求める。その方法として従来からの細線化手法⁽⁸⁹⁾の改良手法（以下これを本手法という）を提案する。以下にそのアルゴリズムを述べる。

- (1) 図4-1(a)に示す 3×3 窓を考え、中心画素の右隣（図中0）を0-隣接、上を2-隣接、左隣を4-隣接、下を6-隣接とする。これらを総称して N -隣接とする($N=0, 2, 4, 6$)。さらに背景の画素値を0、対象物上の画素値を1、スケルトンと定義された画素値を2、そして、作業用として、処理途中で背景に置き換える可能性のある画素値を3とする。まず、 $N=0$ とし0-隣接より処理を始める。
- (2) 画面内で、 3×3 窓を走査し、中央画素が1、 N -隣接が0である画素を見つける。その時、 3×3 窓が図4-1(b), (c), (d)の何れかのパターンと一致しているか調べ、一致していれば中央画素に値2を付与し、一致していなければ値3を付与する。但し、図中で同一アルファベットを付与したものは、その中で少なくとも一つ0以外の値を持つことを示している。ここで、従来の手法では、比較パターンは(b)(c)のみであったが、この時図4-2で示す局所パターンが存在すると、中央の画素を背景に置き換えてしまい、画像が分離されてしまう。樹状突起のように細い画像の認識には、この性質は適さない。そこで、筆者らは、図4-1(d)のパターンを追加することを提案する。
- (3) 3×3 窓を全画面走査した後、値3の画素の値を0とする。
- (4) $N=2, 4, 6$ と順に変化させ(2)(3)の処理を繰り返す。

図4-3(a)は、網膜細胞の二値画像例で、(b)は、上記提案アルゴリズムの細線化手法を適用した結果である。樹状突起の骨格線が正確に抽出されている。

4.3 従来の細線化手法と提案手法との比較

4.3.1 従来より提案されている細線化のアルゴリズム

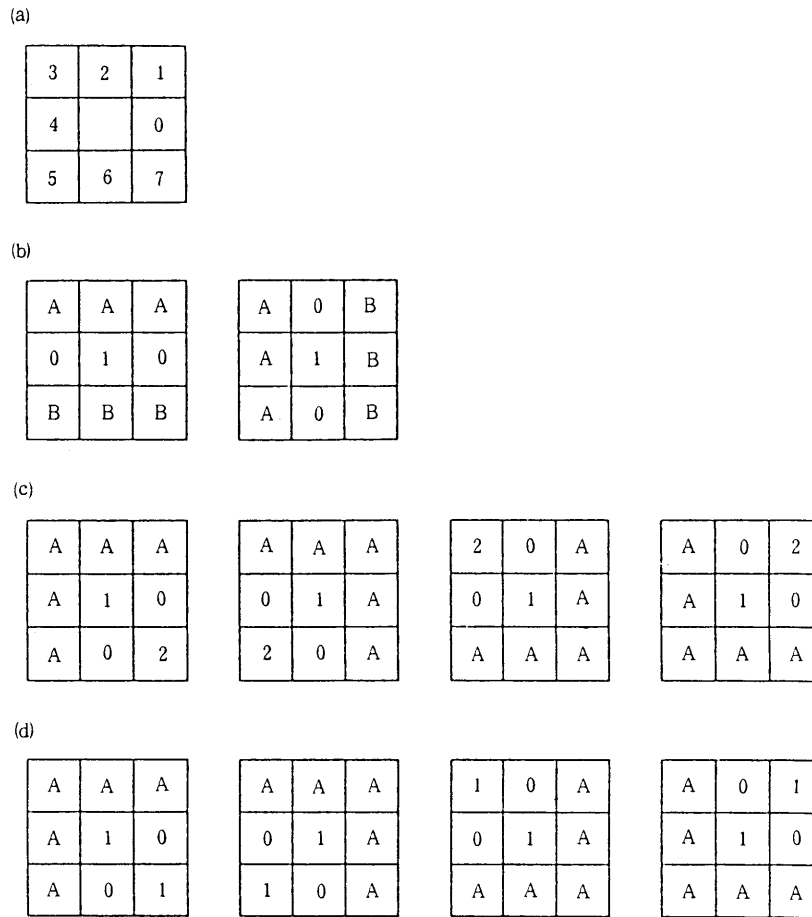


図4-1 本手法の細線化アルゴリズムにおけるN-隣接の定義と骨格線の局所パターンの定義.

(a)N-隣接の定義, (b) (c) (d) 骨格線の局所パターン

細線化手法による画像のスケルトン化は、従来からいくつか提案されている^{(103),(104),(105),(106),(107)}。ここでは、ソフトウェアが公開されているいくつかのアルゴリズム⁽¹⁰³⁾と4. 2で述べた筆者らの提案手法との比較について検討する。これらの方法は、文字認識等を対象として検討されたものや、細線化処理の高速化、並列処理を検討したもので、筆者らの樹状突起の認識という研究対象とは異なる。しかし、これらの方法により樹状突起を認識することも可能と考えられるので、比較検討する。まず、簡単にそれらのアルゴリズムを述べる。

<方法1>Hilditchのアルゴリズム⁽¹⁰⁸⁾

3×3の窓で画面を走査し、窓の中央が対象物上の画素であり、次の5つの条件を満たすとき、その画素を背景の画素に置き換え、変化する画素がなくなるまで処理を繰り返す。

(条件) 1)窓内の8近傍に一つ以上背景上の画素が存在する。 2)窓内の8近傍に二つ以上の対象物上の画素が存在する。 3)中央の画素を背景に置き換えても8一連結性が崩れない。 4)走査途中、既走査画素を含め、窓内に一つ以上の対象物上の画素が存在する。 5)既走査部分の画素も含めて中央画素を置き換えても窓内の連結性は変化しない。この方法で、図4-4

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 0 |
| 1 | 1 | 0 |
| 1 | 0 | 1 |

図4-2 従来の細線化手法により骨格線が分離される例

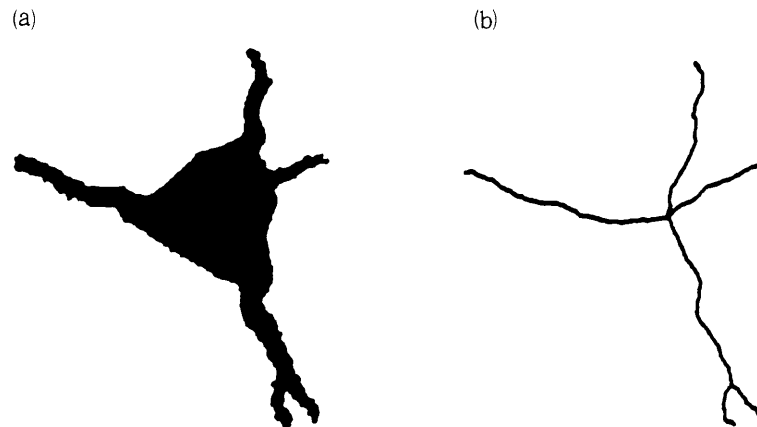


図4-3 ナマズ網膜の神経節細胞の2値画像を細線化手法により骨格線化した例。

(a) 細胞の2値画像 (b) (a)を細線化手法により骨格線化した結果

(a)を細線化した結果を図4-4(c)に示す。

<方法2>鶴岡らのアルゴリズム⁽⁵³⁾

方法1を改良したもので、方法1の条件3), 5)の8連結の求め方が異なる。即ち、まず、 3×3 窓の中央画素を対象物上の画素と置き換えたとき、上下左右の4近傍との連結性が保存される点を探しその中でさらに、8近傍点との連結性が保存されるものだけ背景画素に置き換える。この方法で図4-4(a)を細線化した結果を(d)に示す。

<方法3>Deutschのアルゴリズム⁽¹⁰⁹⁾

3×3 窓を走査し、窓中央の対象物上の画素に関し、以下に述べる1)~4)の条件全てと5)の条件は、図4-5(a)(b)のいずれかを満足する点を背景との置き換え可能な画素とする。この操作を置き換える画素がなくなるまで繰り返す。

(条件) 1) 連結および孤立点除去条件として窓内の周り8点を反時計方向に調べ0から1へ変化する回数が0, 2, 4. 2) 窓内の周り8点に対象物上の画素が2つ以上存在する. 3) 左右と上の点の少なくとも1つが背景上の画素. 4) 左右と下の点の少なくとも1つが背景上の画素. 5) 図4-5(a)または図4-5(b)において、 $A_1 + A_2 \geq 1$ の条件およびBの内いずれか1つがゼロである。図4-4(a)を細線化した結果を(e)に示す。

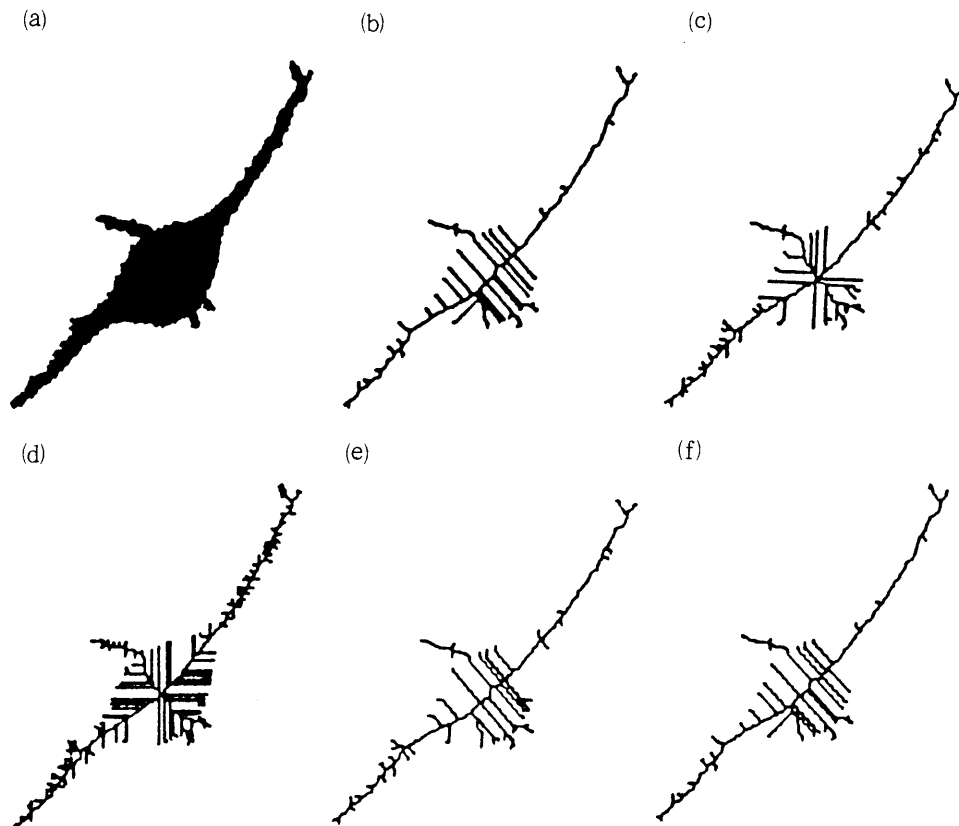


図4-4 ナマズ網膜の神経節細胞の2値画像を提案手法とその比較手法により細線化した結果

- (a) 細胞の2値画像 (b) 提案手法 (c) Hilditch のアルゴリズム
(d) 鶴岡のアルゴリズム (e) Deutsch のアルゴリズム
(f) 田村のアルゴリズム

(a)

| | | |
|-------|---|-------|
| B | B | A_1 |
| B | | 1 |
| A_2 | 1 | B |

(b)

| | | |
|-------|---|-------|
| A_1 | 1 | B |
| B | | 1 |
| B | B | A_2 |

図4-5 Deutsch のアルゴリズムにおいて、背景と置き換え可能な点の局所パターン

<方法4>田村のアルゴリズム⁽¹¹⁰⁾

4. 2で述べたアルゴリズムと基本的には同じであるが、スケルトンかどうかを判定する局所窓のパターンが図4-6に示すように異なる。図4-6において、 y は、このうち少なくとも一つは0であることを示し、 z に関しては、このうち少なくとも一つ1であることを示している。

まず、図4-6のスケルトンのパターンにおいて図4-1に含まれないものは、図4-6

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

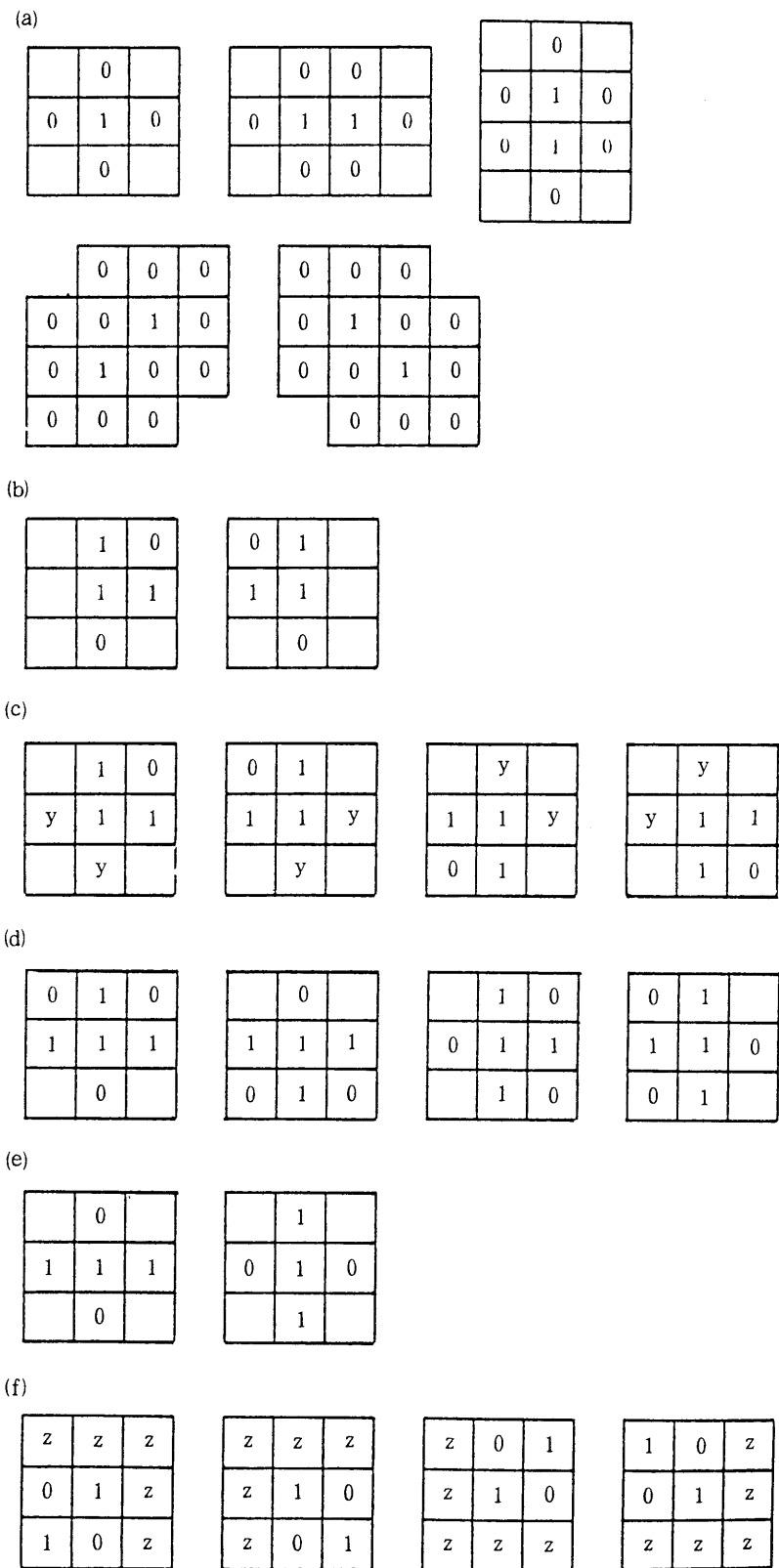


図4-6 田村のアルゴリズムにおける骨格線の局所パターン

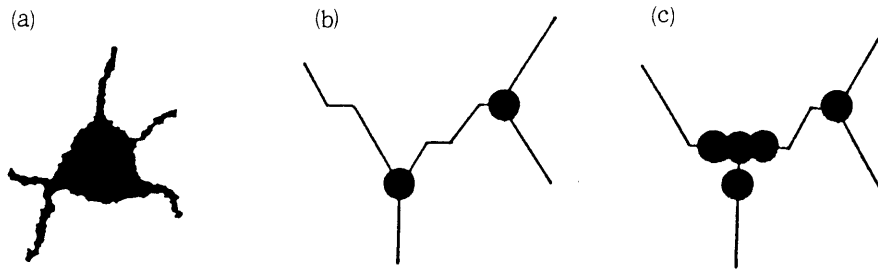


図4-7 本手法と田村のアルゴリズムの細線化による樹状突起の分岐点における骨格線パターンの相違

(a) 細胞の2値画像 (b) 本手法と (c) 田村のアルゴリズムにより

(a) を細線化した結果の分岐点付近の拡大図

表4-1 1個の細胞像を各細線化手法で細線化を行った際の計算時間の比較

| 細線化の手法 | 計算時間 |
|--------|--------|
| 本手法 | 1' 24" |
| 方法1 | 1' 03" |
| 方法2 | 0' 55" |
| 方法3 | 1' 15" |
| 方法4 | 2' 00" |

(a) の孤立点保存条件と、(b) (c) (d) とである。樹状突起の認識においては、対象物である細胞画像のみを細線化するため、(a) の孤立点保存条件は必要ない。さらに、(b)、(c)、(d) に関しては、骨格線の分岐点をすべて4連結として保存するものである。ところが、本手法では、この場合窓の中央画素を背景として置き換え、分岐点は、8連結となる。いずれの方法においてもスケルトンは切断されない。図4-7は、(b) 本手法と(c) 方法4により図4-7(a)を細線化し得られた骨格線の3本の樹状突起の分岐点付近の拡大図である。図4-6(c) (d) の骨格線のパターンを保存する方法4と保存しない本手法による相違が分岐点の骨格線パターンに現れている。図の●は8近傍内の骨格線上に3点以上の点が存在するという特徴によって分岐点とみなされた点を表す。本手法では、分岐点は2点のみであるが、方法4における図4-6(c) の骨格線の局所パターンを持つ(c) では分岐点の候補が5点存在し、実際には2個存在する分岐点を多数個存在すると誤認する可能性がある。従って、本研究の目的である樹状突起の特徴抽出のための細線化には図4-1に示す骨格線パターンの方がやや適していると考えられる。

方法4による図4-4(a)の細線化の結果が(f)である。また、図4-4(b)は、(a)の二値画像を本手法により細線化した結果である。図4(b)～(f)を比較すると、(b)と(e)、(f)は、類似したスケルトンとなっている。特に、今回提案の手法は、方法4と類似したアルゴリズムであるが、比較する局所窓のパターンの数が少ない。そのため、計算時間の短いところに特徴がある。実際に、1個の細胞に関して、各細線化手法で処理した計算時間の比較を表4-1に示す。また、1～3の方法では、樹状突起の認識という観点からは、アーチファクトのスケルトンが多かった。

4. 3. 2 シミュレーション図形を用いた各手法の評価

細胞の樹状突起のように細長く伸びる部分のスケルトンを抽出し、角あるいは、輪郭線の変動に伴うスケルトンの抽出が少ないという観点で細線化手法を検討するためのシミュレーションの方法とその結果を述べる。シミュレーションに用いた図形は、三角形に突起を付属させた図4-8(a)と、図4-8(a)の輪郭線を平均値0で、三角形部分は標準偏差2、突起部分は標準偏差1の白色雑音で変動させて構成した図4-9(a)である。図4-8, 図4-9いずれも、(b)が本手法(c)(d)(e)(f)が比較のために行った4. 3. 1で述べた方法1~4による細線化の結果である。図4-8から(b)(f)と他の手法を比較すると前者は、スケルトンが突起の先端から三角形の重心までであるが、後者は、それ以外に三角形の角からのスケルトンがえられた。図4-9からも、輪郭線の変動に伴うスケルトンの数が少ないのは(b)と(f)である。さらに、樹状突起の認識において、スケルトンの方向は、突起の方向を保存する必要がある。図4-9(b)(e)(f)は、この条件を満たしている。以上の結果より樹状突起の認識に適する手法は、本手法と方法4である。また、表4-2は、シミュレーションにかかった計算時間を示す。(a)は図4-8に関するもの、(b)は図4-9に関するものである。これらの結果から、計算時間は、本手法の方が方法4の約2分の1となっている。

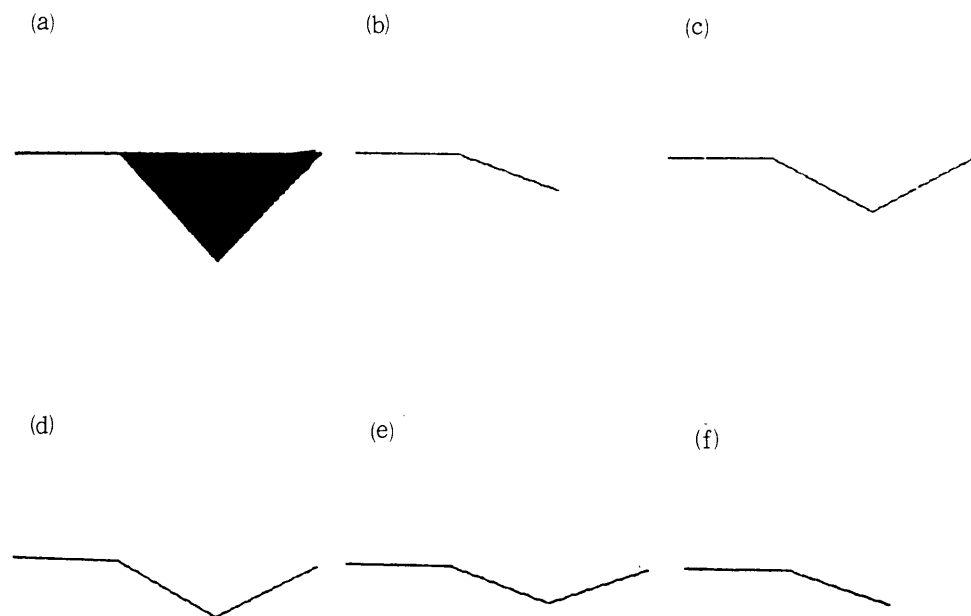


図4-8 シミュレーション図形を用いた各細線化手法の比較

- (a) 細線化の対象としたシミュレーション図形 (b) 提案手法
(c) Hilditch のアルゴリズム (d) 鶴岡のアルゴリズム
(e) Deutsch のアルゴリズム (f) 田村のアルゴリズムによる
(a) の骨格線

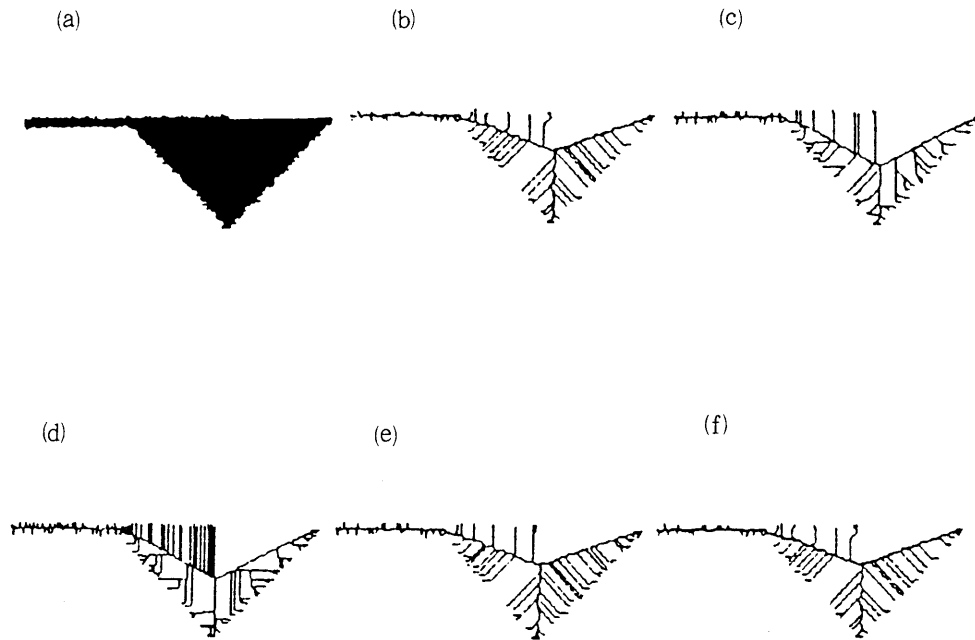


図4-9 輪郭線を白色雑音で変動させたシミュレーション図形を用いた各細線化手法の比較

- (a) 細線化の対象としたシミュレーション図形 (b) 提案手法
 (c) Hilditch のアルゴリズム (d) 鶴岡のアルゴリズム
 (e) Deutsch のアルゴリズム (f) 田村のアルゴリズム による (a) の骨格線

4. 3. 3 網膜細胞画像を用いた従来法との比較検討

本節では、4. 3. 2において、本手法と大略同様の骨格線が得られた方法4と本手法とを網膜細胞像を対象として比較検討した結果について述べる。用いた細胞像は、光学顕微鏡のボケ、染色の不鮮明さの影響などから輪郭線が滑らかでない。そこで、細線化を行う前に4. 4で述べる輪郭線の平滑化処理を行った。

ナマズ網膜細胞画像100個に関して、本手法と方法4とで細線化を行い樹状突起の骨格線かどうかを検討した。計算機により、第5章で述べる手法で骨格線の端点と分岐点を認識し、ヒトが細胞画像をみて正しいかどうかを判定した。その結果、本手法では、92個の細胞で樹状突起の端点と分岐点を正しく認識した。誤って、認識した内容は、細胞体の重心付近から始まる骨格線の端点を樹状突起の先端の端点と認識したものが4例、細胞体の輪郭線に尖りがあった場合にそこからの骨格線を樹状突起と誤認したものが4例であった。方法4においては、89個の細胞で正しく認識が行われた。方法4で誤認識された11例の内8例は、本手法で認識できなかった細胞像と同一のもので、誤認識した理由も同じであった。さらに、その他3例に関しては、1例は、図4-10(a)に示す樹状突起の無い細胞に関して、細胞体の骨格線が重心付近に縮退せず、(b)のように長くなり樹状突起と認識した。(c)に本手法で細線化した結果を示す。骨格線は、重心付近で1点に縮退し、さらに孤立点除去条件により削除された。もう

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

表4-2 シミュレーション図形を各手法で細線化した際の計算時間の比較

(a) 図4-8(a)に示す三角形に突起を付与した図形 (b) 図4-9(a)に示す三角形に突起を付与した図形の輪郭線を白色雑音で変動させた図形

| (a) | |
|--------|--------|
| 細線化の手法 | 計算時間 |
| 本手法 | 2' 42" |
| 方法1 | 1' 44" |
| 方法2 | 1' 06" |
| 方法3 | 2' 32" |
| 方法4 | 5' 21" |
| (b) | |
| 細線化の手法 | 計算時間 |
| 本手法 | 2' 39" |
| 方法1 | 1' 57" |
| 方法2 | 1' 24" |
| 方法3 | 2' 47" |
| 方法4 | 5' 04" |

2例は、分岐点の数が多く認識された。(d)の細胞像を方法4で細線化した結果を(e)、本手法で細線化した結果を(f)に示す。(f)と比較し(e)には樹状突起以外の短い骨格線が1本現れていることが分かる。

以上の結果から、本手法による細線化では、かなり正確に樹状突起の骨格線が抽出できたことが分かる。従って、本手法は、細胞画像の樹状突起の解析には適した細線化手法と考えられる。

4.4 樹状突起認識精度向上のための細線化の前処理

4.4.1 輪郭線の変動に伴うアーチファクトの平滑化

図4-11は、4.2で述べた手法により抽出した細胞像の骨格線である。(a)は樹状突起の骨格線のみが抽出されているが、(b)に関しては、輪郭線の変動による骨格線や、細胞体の尖りに伴う骨格線が抽出された。このような例は、100個の細胞画像中92個と多数存在した。従って、ここでは細胞像の輪郭線の局所変動を除去し平滑化することにより樹状突起のみの骨格線を抽出する方法について述べる。輪郭線の平滑化手法として、以下の4手法について検討した。

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

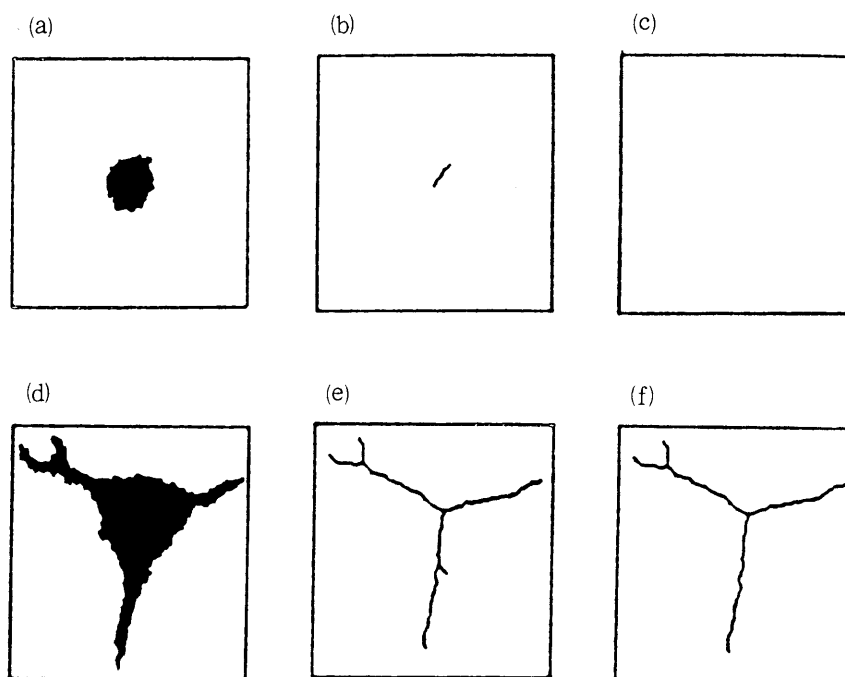


図4-10 田村の手法と提案手法による骨格線化に相違が現れた細胞像の例

(a) 細胞体みの細胞像 (b) 田村の手法により抽出した(a)の骨格線

(c) 提案手法により骨格線が抽出されなかった例 (d) 細胞画像

(e) 田村の手法と (f) 提案手法により抽出された骨格線

<手法1>

全画面を走査し、対象物上の画素に関して4近傍中に対象物上の画素が一つの場合、中央の画素を背景に置き換える。変化する画素が存在しなくなるまでこの操作を繰り返す。

<手法2>

二値画像に関し、背景を0、対象物上の画素を1とする。画面で 3×3 局所窓を走査し、局所窓内9点の平均値を求める。平均値がある閾値以下の時、窓の中央画素値を0、すなわち背景の画素とする。なお閾値の決定法に関しては、4.4.2及び4.4.3で述べる。

<手法3>

二値画像に関し、背景を0、対象物上の画素を1とする。画面で 5×5 局所窓を走査し、局所窓内25点の平均値を求める。平均値がある閾値以下の時、窓の中央画素値を0とする。

<手法4>

二値画像に関し、背景を0、対象物上の画素を1とする。画面で 5×5 局所窓を走査し、局所窓内で図4-12に示す重み付き平均値を計算する。この値がある閾値以下の時、窓の中央画素の値を0とする。

4.4.2 シミュレーションによる平滑化手法の検討

シミュレーション図形を用いた最適な輪郭線の平滑化手法の決定法および、閾値による平滑

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

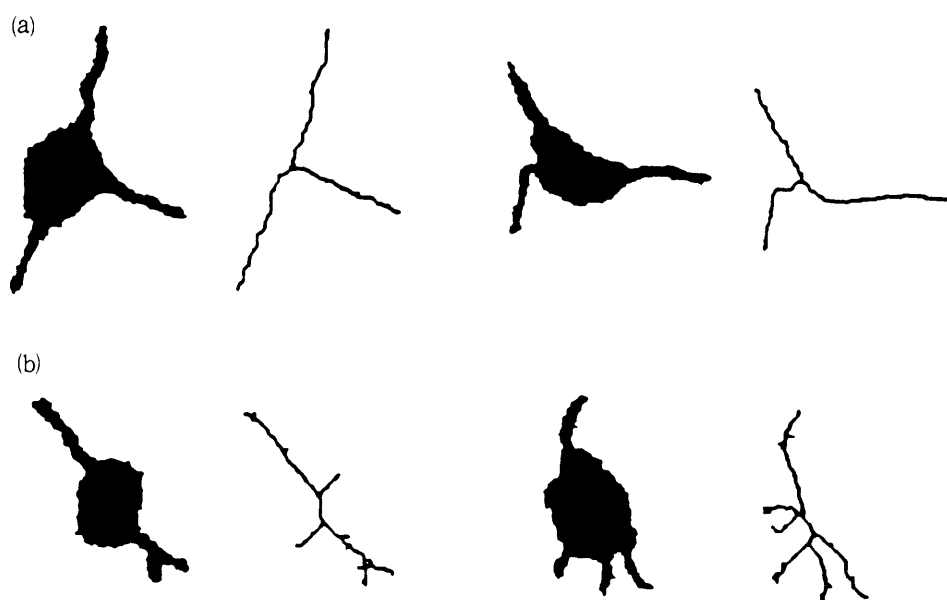


図4-11 細胞の2値画像を細線化した例

(a) 樹状突起の骨格線のみ抽出した例 (b) 細胞体の尖り、輪郭線の変動アーチファクトの影響による骨格線を含んだ例

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 1 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

図4-12 細線化の前処理（方法4）で用いる5×5局所窓の重み

表4-3 長方形の幅に対し、各前処理の手法により長方形の一部が縮退した時の閾値（各枠上段）と長方形が削除されたときの閾値（各枠下段）

| 幅 | 手法1 | 手法2 | 手法3 | 手法4 |
|---|-----|------------|------------|------------|
| 1 | 孤立点 | 0.3 0.4 | 0.1 0.2 | 0.2 0.3 |
| 2 | 保存 | 0.5 0.7 | 0.3 0.4 | 0.4 0.5 |
| 3 | 保存 | 0.5 1.0 | 0.4 0.6 | 0.4 0.8 |
| 4 | 保存 | 0.5 1.0 | 0.4 0.8 | 0.4 0.9 |
| 5 | 保存 | 0.5 1.0 | 0.4 1.0 | 0.4 1.0 |

化の効果の評価法に関する検討結果について述べる。最適な平滑化法の条件は、輪郭線のランダムな局所変動をすべて除去し、しかも比較的幅が狭く長く伸びる樹状突起が途中で切断されないことである。従って、まず突起の幅による切断に関するシミュレーションを行った。シミュレーション図形は、幅を1～5画素の範囲で変化させた長方形である。表4-3は、長方形の幅（太さ）に対し、各手法で長方形の一部が縮退したときの閾値（上段）と、長方形が削除された時の閾値（下段）とを示す。この結果から、図形の幅が5画素以上であれば、図形は切断されないことが分かる。幅がそれ以下の場合、手法1では長方形が保存され樹状突起の切断が生じないことが分かる。手法2～手法4の閾値に関しては、手法2が最も大きい閾値をとる場合でも長方形は保存される。同一の局所窓の大きさ 5×5 に関しては、重み付き平均値を用いた手法4の方が手法3に比し図形が削除される値が大きく、図形の切断の可能性は少ない。

次に、輪郭線の変動に伴う骨格線生成に関するシミュレーションを行った。用いた図形は、幅5画素の長方形の各辺の輪郭線に正規乱数で長さを決定した局所的な突起を付与したものである。手法、閾値の評価は、次の2変量を用いて行った。すなわち、(1)与えた長方形の辺に突起として付与された画素数と平滑化により除去された突起上の画素数との比。(2)長方形上の画素で、平滑化により失われた画素と幅5の長方形上の画素数との比である。これら二つの値が小さい手法が最も輪郭線変動を除去する効果があり、かつ樹状突起等対象物の切断が少ない最適な手法と考えられる。

図4-13は、最適な平滑化手法および、平滑化における値決定のための基礎的資料として求めたもので、輪郭線の変動に用いた正規乱数の標準偏差別に、手法2, 3, 4における閾値に対する平滑化の評価量を示す。正規乱数の標準偏差は、図右肩にSDで示した。図で○が手法2, ●が手法3, ◐が手法4を示す。いずれも右下がりの曲線が雑音の残留率、右上がりの曲線が対象物の削除率を示す。図では示していないが、手法1においては、対象物上の点は削除されなかったが、雑音の残留率に関しては、(a) 0.7, (b) 0.67, (c) 0.54, (d) 0.44であった。これらの結果から変動の標準偏差が3以上になると、今回述べた手法では変動に伴うアーチファクトを除去できないことが分かる。また、標準偏差が1と0.8の場合（図4-13(c)と(d)）、アーチファクトの除去効果が最もよいのは手法2であるが、この手法は対象物上の点が削除される割合も高い。以上を総合すると、雑音を除去しかつ対象物上の点を残す最適な手法は、手法4の 5×5 局所窓を用いた重み付き平均値を利用した場合であることが分かる。さらに、雑音除去の局所平均値の値は、0.6～0.7の値を採用すればよいと考えられる。

4. 4. 3 網膜細胞像を用いた前処理の効果の評価

ここでは、シミュレーション結果に基づき細胞像を用い、前処理の効果の評価を行う。まず、実際の細胞100個を用い、輪郭線の局所変動の標準偏差を求めた。輪郭線の変動の大きさは、輪郭線を追跡しながら、連続する3点に関し両端2点を結び、その線分から中央画素までの距

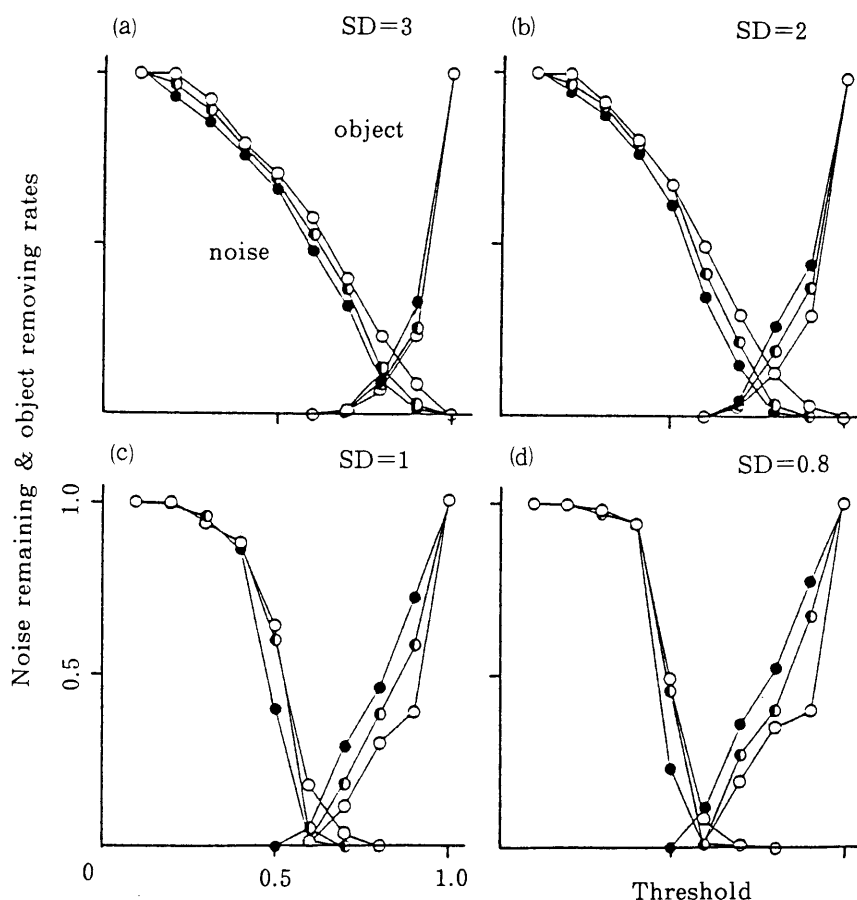


図4-13 シミュレーション図形を用いた雑音残留率と対象物の削除率による各平滑化手法の評価
輪郭線変動に用いた正規乱数の標準偏差が(a)3, (b)2, (c)1, (d)0.8の場合

離として定義した。例えば、3点が直線上に並べば0、水平な直線で1点の突起があれば1となる。この局所変動の標準偏差を100個の細胞像で求めた結果、その平均値は0.77、標準偏差は0.17であった。従って、4.4.2で述べた正規乱数を用い輪郭線を変動させるシミュレーションにおいて、図4-13(d)に示す標準偏差を0.8とした結果を用いれば、細胞像を用いる場合の最適な閾値を決定することができる。すなわち、4.4.2で述べた二つの評価量の和が最小となるものと、雑音がすべて除去された時点で、対象物上の画素の除去率が最も小さいものとの比較を行った。前者では、手法4すなわち 5×5 重み付き平均値で閾値が0.6の場合、二つの評価量の和は0.02であった。後者では手法3すなわち 5×5 局所窓を用いた平均値で値が0.7の場合、長方形上の画素の除去率は0.36であった。この二つの手法を用いて、100個の細胞像に関して前処理を行い細線化し、第5章で述べる手法により樹状突起の特徴抽出を行った結果、手法4における閾値0.6の場合は97個、手法3における閾値0.7の場合は93個の細胞に関して正しく特徴抽出できた。図4-14において、いずれの前処理を用いても正しい樹状突起の骨格線が抽出できた例を示す。手法4による前処理の結果正しく認識できたが手法3による前処理では正しく認識できなかった例は、図4-15に示す例のように、

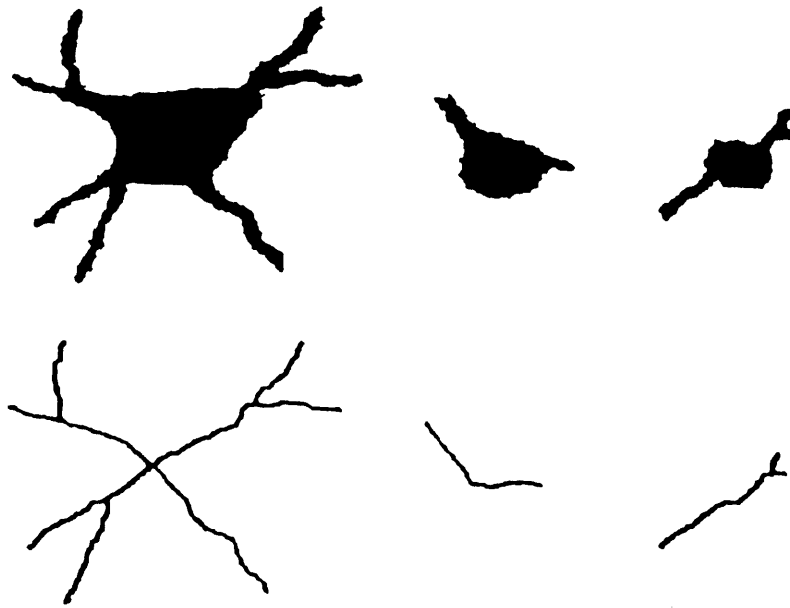


図4-14 前処理として 5×5 重み付き平均値が0.6以下と 5×5 局所窓の平均値が0.7以下の画素を除去するいずれの場合も正しく樹状突起の骨格線が抽出された例

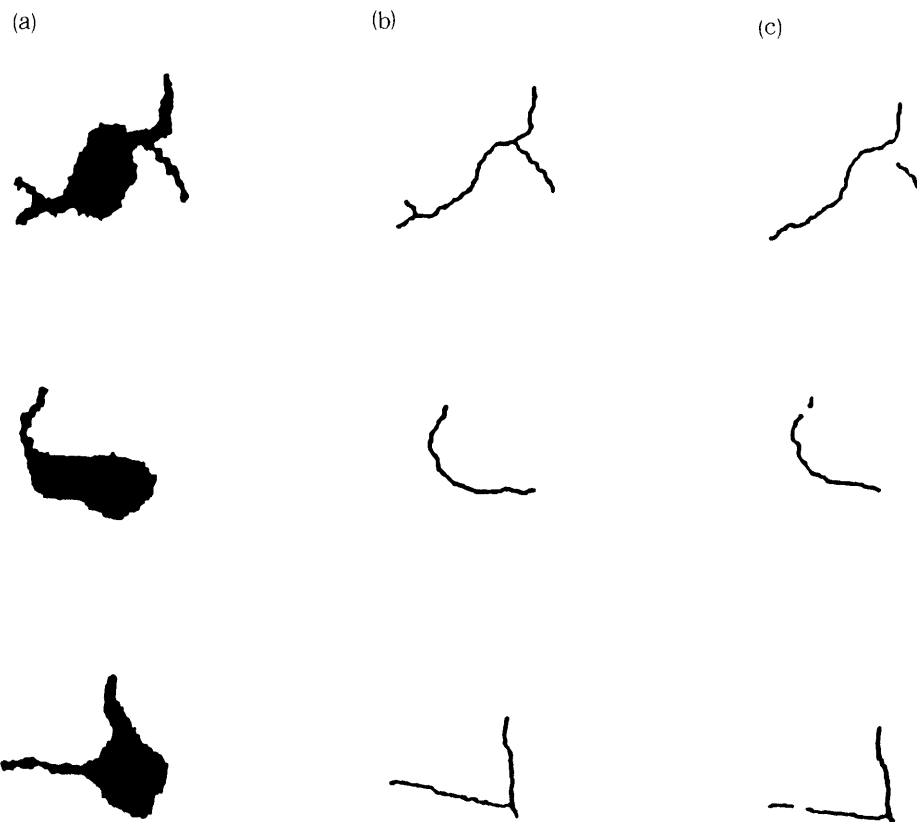


図4-15(a)の細胞画像を細線化する前処理として(b) 5×5 重み付き平均値が0.6以下の画素を除去した場合は正しく樹状突起の骨格線が抽出されたが、(c) 5×5 局所窓の平均値が0.7以下の画素を除去すると骨格線の切断および削除が生じた例

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

樹状突起の骨格線が切断したり，短い突起が削除される場合であった．二手法いずれの前処理によっても正しく認識できなかった例は，図4-16に示すように細胞像の重心と細胞体の重心のずれが大きく，細胞体の重心付近の端点を樹状突起の端点と認識したものである．

以上から細胞像を対象として最適な前処理の方法はシミュレーションにおいて雑音残留率と対象物の除去率の和が最小となる手法で， 5×5 局所窓の重み付き平均値が0.6以下の画素を背景に置き換える手法であるとの結論を得た．

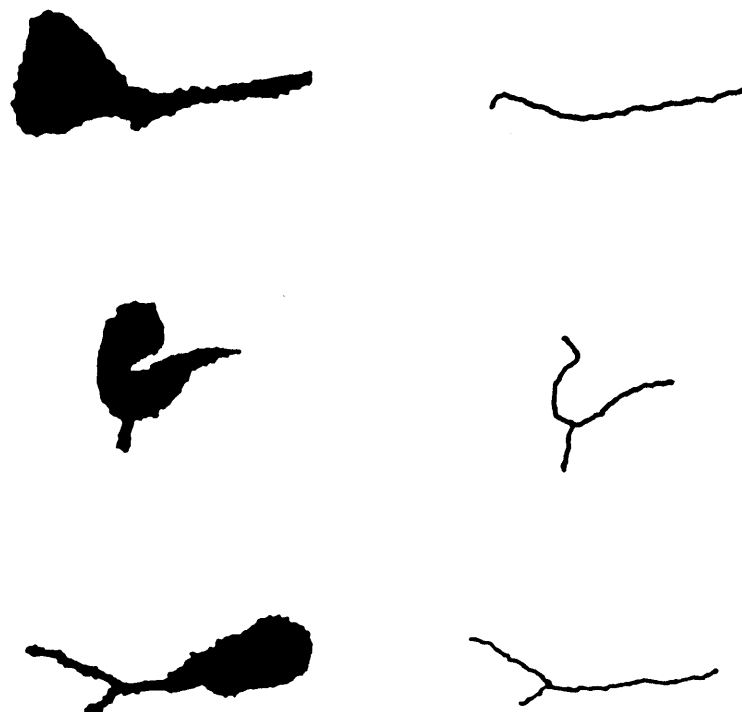


図4-16 細胞画像と細胞体画像の重心のずれの影響で，前処理を施しても，骨格線より樹状突起の正しい特徴抽出が行えなかった例

4.5 むすび

本章では，細胞形態学の分野で関心がもたれ，また，細胞の形態と機能の関連の解析の一助となる細胞の樹状突起の画像処理による形状認識に関して述べた．樹状突起の特徴抽出をするため，突起の骨格線を抽出する細線化手法を検討した．この細線化手法は，輪郭線等の変動による局所的な突起の骨格線は除去し，樹状突起のような細長い突起の骨格線のみを抽出する必要がある．この観点から，文字認識などの分野で提案されてきたいくつかの秀れた細線化手法について検討し，網膜細胞における樹状突起のパターン認識に特徴を持つように改良した細線化手法を提案した．この改良手法について従来からの細線化手法との比較も含めて検討したところ，この改良手法が樹状突起のパターン認識に対して適した方法であることが確かめられた．

さらに，光学顕微鏡のボケ，染色の不鮮明さに起因し，変動を示す輪郭線を持つ細胞像の樹

第4章 樹状突起認識のための網膜細胞画像における細線化手法

状突起の正確な特徴抽出のため、輪郭線の変動を除去する手法として、従来濃淡画像の雑音除去で行われた局所窓内の平均値を用いた手法を二値画像へ適用することを提案した。この時、ある画素を雑音として除去するための平均値の閾値をシミュレーション図形を用いて決定する方法についても検討した。これにより、今回行った細胞画像の解析には、 5×5 重み付き平均値の値が 0.6 以下であれば雑音とみなし除去する前処理が最適であった。この前処理に関しては、文字認識等骨格線抽出を必要とする画像処理において、まず輪郭線の局所変動の標準偏差を求め、その値を用いたシミュレーション結果から最適な前処理の手法を選択し、より正確な骨格線を求める等の応用が可能である。

第5章 網膜細胞画像の形態に関する特徴抽出

5.1 はしがき

本研究において構築を行った細胞画像認識システムは、対象とする多数の細胞画像から少数の簡単な特徴量を抽出し、それを用いて定量解析を体系的に行うことを目的としている⁽⁷¹⁾。本章では、第3章、第4章に述べた記述形式により保存されている細胞体画像および樹状突起の骨格線から得られた形態に関する特徴抽出法と、その特徴量を用いた統計解析、多変量解析の手法について述べ、さらにナマズ網膜の神経節細胞を対象とする形態解析例について述べる。

画像処理による形態の特徴抽出については、一般図形に関するものがいくつか提案されている^{(111),(112),(113)}。また臨床分野においても、細胞画像による診断や癌細胞の抽出^{(114),(115),(116)}、染色体の計測^{(117),(118)}、血球の計数^{(119),(120),(121)}など各種の報告がなされている。しかし、生物学の分野では、第4章に述べたように、1つの細胞像の形態の詳細な解析に多くの関心をもたれ、多数の細胞画像を対象として画像処理の手法により形態の特徴抽出を行っている例はみない。

本研究では、網膜細胞の2値画像とその近似図形に対して、面積、周囲長などの大きさを表現する特徴量と、細長さや、輪郭線の複雑さなど形状に関する特徴量を求めた。また、第3章に述べた細胞体画像の1次元あるいは2次元の系列データを用いた表現に対しては、相関係数、パワースペクトル密度関数などその周波数に関する特徴量を求めた。樹状突起に関しては、骨格線の端点や、分岐点の位置、分岐点間の隣接関係など構造に関する特徴抽出を行った。

本章では、5.2において画像処理による細胞体画像の特徴抽出法と、ナマズ網膜における神経節細胞の細胞体画像からの形態に関する特徴量の抽出例について述べる。5.3では、画像処理による樹状突起の骨格線に関する特徴抽出法と、ナマズ網膜における神経節細胞の樹状突起形状の特徴抽出例、および細胞体形態と主樹状突起の特徴との関連についての解析例を述べる。次に、細胞画像の形態の特徴量を用いた分類手法とその手法のナマズ網膜の神経節細胞画像を対象とした適用例、および多変量解析手法とその手法を用いた解析例について検討する。形態解析に関しては、テンプレートの細胞像に対し類似度の大きいものから順に検索を行うテンプレートマッチングと、特徴量空間において類似度の大きいものから順にグループとしてまとめていくクラスタリングを行った^{(122),(123)}。多変量解析としては、細胞形態に関して複数個の特徴量相互の関連を統計的に解析する主成分分析⁽¹²⁴⁾と、その形態分類への応用、さらに同種あるいは異なる集団の細胞形態の特徴付けを行う判別分析⁽¹²²⁾を行った。

さらに、5.4において分類手法とその手法を用いた解析例を、また、5.5において多変量解析の手法とその応用例について述べる。なお、本章においては第1章に述べた理由により網膜細胞を3次元としてはとらず、2次元画像に関して解析している。

5. 2 画像処理による細胞体形態の特徴抽出

5. 2. 1 細胞体の2値画像の特徴量

細胞体の2値画像および細胞体の輪郭線の近似図形から抽出した各種の特徴量について以下に述べる。

- (1) 面積：2値画像の対象物を構成する画素数をラスタースキャンにより測定し、顕微鏡画像の標本化時に同時に測定した単位面積当りの構成画素数で除して面積を求める。輪郭線画像に関しては、輪郭線で囲まれる1点から領域拡張の手法⁽⁸¹⁾により、輪郭線に囲まれる全領域を塗りつぶすことにより2値画像を構成して面積を求める。
- (2) 長径、短径：対象物の重心を通り2つの輪郭線上の点を結ぶ線分を直径として定義する。直径を一定角度間隔で測定し、その最大値を長径、最小値を短径として定義する。
- (3) 周囲長：対象物の輪郭線を追跡し、追跡の距離で周囲長を定義する。
- (4) 半径の平均値と分散値：対象物の重心から輪郭線までの距離を半径として定義する。半径を一定角度間隔で測定しその平均値と分散値を求める。
- (5) 長径/短径：(2)の長径と短径の比を求めたもので、図形の細長さを表す特徴量である。
- (6) 周囲長²/面積：(3)の周囲長の平方と(1)の面積との比で、図形の輪郭線の複雑さを表現する特徴量である。

5. 2. 2 細胞体の系列データ表現における特徴量

次に、3. 6. 2, 3. 6. 3で述べた細胞体の系列データ表現における特徴量について述べる。以下、系列データを $X = \{x(i) \mid i=1, 2, \dots, N\}$ とする。

- (1) 相関関数⁽¹²⁵⁾：(5-1)式に示す相関関数 $R(\tau)$ を求めた。これは、系列データの周期性等を評価する特徴量である。

$$R(\tau) = \sum_{i=1}^{N-\tau} x(i)x(i+\tau) / (N-\tau) \quad (5-1)$$

- (2) フーリエ変換によるパワースペクトル密度関数：系列データを(5-2)式に示す式でフーリエ変換し、そのパワースペクトルを(5-3)式から求めた。これは、系列の周波数に関する解析を行う特徴量である。

$$X_R(f) = (1/\pi) \sum_{i=1}^N x(i) \cos(2\pi fi)$$

$$X_I(f) = (1/\pi) \sum_{i=1}^N x(i) \sin(2\pi fi) \quad (5-2)$$

$$P(f) = \sqrt{X_R^2(f) + X_I^2(f)} \quad (5-3)$$

但し $X_R(f)$: $x(i)$ をフーリエ変換した結果の実部

$X_I(f)$: $x(i)$ をフーリエ変換した結果の虚部

f : 周波数

- (3) 自己回帰モデル当てはめによる線形予測係数⁽¹²⁶⁾：系列データに関して任意の点の値 $x(i)$ をその点に先行する p 個の値で予測する(5-4)式の自己回帰モデルで表現する。モデルの記述パラメータである線形予測係数を特徴量とすることで少数の値で系列を表現することが可能となる。

$$x(i) = \sum_{k=1}^p a(k) x(i-k) + Z(i) \quad (5-4)$$

但し $\{a(k) \mid k=1, 2, \dots, p\}$: 線形予測係数

$Z(i)$: 予測誤差で正規乱数系列となる

- (4) 線形予測係数から求めたパワースペクトル密度関数⁽¹²⁶⁾：(2)と同様、系列の周波数情報を表現する特徴量である。(2)を平滑化したパワースペクトルとなり周波数情報の特徴抽出に有利である。線形予測係数を用い(5-5)式でパワースペクトル $P(f)$ が求められる。

$$P(f) = 2S_z^2 / |1 - \sum_{k=1}^p a(k) \exp(-j2\pi f k)|^2 \quad (5-5)$$

但し S_z^2 : (5-4)式の予測誤差 $Z(i)$ の分散

$a(k)$: (5-4)式の線形予測係数

f : 周波数 ($0 \leq f \leq 1/2$)

- (5) 2系列の相互相関関数 : 3. 6. 3で述べた2次元の系列データに関する特徴量で、2系列の相関の強さ、相関の周期性を評価し、(5-6)式により定義する。

$$R_{xy}(\tau) = \sum_{i=1}^{N-\tau} x(i) y(i-\tau) / \sqrt{\sum_{i=1}^N x(i)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N y(i)^2} \quad (5-6)$$

τ : 相関を求める2系列の点の距離(遅れ)

5. 2. 3 ナマズ網膜の神経節細胞における細胞体形態に関する特徴抽出例

ここでは、ナマズ網膜の神経節細胞における細胞体形態に関する特徴抽出を行い、その基本統計量による解析例について述べる。

表5-1は、5. 2. 1に述べた細胞体の2値画像に関する8つの特徴量を500個のナマズ網膜の神経節細胞画像から抽出し、その平均値と標準偏差値を示したものである。この結果、面積の平均値は $166 (\mu\text{m})^2$ でかなりばらつきが大きく、細長さに関しては、平均値が2.1でやや細長い形態のものが多く分かる。

次に、各特徴量の統計分布について検討する。図5-1(a)に、997個の神経節細胞および対象群として与えた20個の双極細胞の細胞体の面積のヒストグラムを示す。図において双極細胞は、約 $50 (\mu\text{m})^2$ の面積の小さい部分に分布が集中している。神経節細胞の面積は、 $100 \sim 200 (\mu\text{m})^2$ に集中している。さらに、面積の大きい方へ、広がった分布を示す数%の巨大細胞の存在を裏付けている。図5-1(b)は、細胞体の細長さを表す、長径/短径のヒストグラムを示す。分布の形状は、対数正規分布に近い分布を示し、長径/短径が3を越えるような細長

い細胞がかなり存在することが分かる。過半数の細胞は長径／短径が2以下であった。

特徴量の間関係を示した解析例を図5-2に示す。図5-2(a)に、521個の細胞体の面積と長径／短径の2次元ヒストグラムを示す。横軸が面積、縦軸が長径／短径を表し、各軸を25等分して、各格子内に含まれる細胞体の数をプロットしたものである。数の多寡は分布の多寡を表現する。図では、対角線方向の分布の集中と横軸方向の分布との2つの部分より構成されていることが分かる。従って、長径／短径が大きい細長い細胞体は、面積も大きいことが分かる。これに対して、長径／短径の小さい膨らみのある細胞体の面積は分布の広がり大きい。図5-2(b)は、細胞体の面積と輪郭線の複雑さの関係を表す周囲長²／面積の2次元ヒストグラムを示す。分布は、細胞体の面積が小さい部分においては、対角線方向に分布が集中しているが、大きくなると分布が広がり、輪郭線の複雑さの変動が大きくなっていることが分かる。

細胞体を一次元系列で表現したときの特徴量の例を図5-3に示す。図5-3(a)は、細胞体画像の一例である。(b)は(a)を極座標展開し、一次元系列で表現したものである。(c)は(b)の自己相関関数を示す。(a)には、3つの顕著な角がありそれと対応して、(b)には3つのピークがみられる。従って、自己相関関数においては、値の大きいところが3箇所存在し、(a)が3つの周期的な部分から構成されていることを示している。(d)は、(b)の系列をフーリエ変換して求めたパワースペクトルである。(e)は、(b)に自己回帰モデルを当てはめて、その線形予測係数より求めたパワースペクトルを表している。(d)と(e)のいずれにも、(b)における120°を単位とする周期成分の存在を示すピークが明確に現れている。

図5-4は、(a)の細胞体を3.6.3に述べた2次元系列で表現した(b)と(c)に関し、その特徴量として(b)と(c)の相互相関関数を求めたものが(d)である。この細胞は、主樹状突起が右上と左下に伸びている。従って、xとyの最大値はおよそ同じ位置である。そのため、(d)のピークが左端にみられる。このピークの位置は、図形の傾きに依存することが分かる。

5.3 網膜細胞の樹状突起形状の特徴抽出

5.3.1 網膜細胞の樹状突起形状の特徴量

第4章で述べた細線化手法を用いて得られた細胞の2値画像の骨格線を用い樹状突起形状の特徴抽出を行った。求めた特徴量は、以下に述べる骨格線の端点、分岐点の位置、分岐点での骨格線の分岐方向である。これらから、樹状突起の本数、長さ、そのなす角度、分岐点間の距離、突起の広がり、面積等の特徴抽出が可能となる。

細胞像の輪郭線に大きな変動がある場合、4.4に述べた前処理では平滑化しきれず微小な長さの骨格線が残る場合があった。これは誤認識の原因となるので、特徴抽出を行う前に長さが3画素以下の骨格線に関しては、その連結性が崩れないことを考慮し除去した。

表5-1 ナマズ網膜神経節細胞の細胞体の形態の8つの特徴量の平均値と標準偏差

| 特徴量 | 平均値 | 標準偏差 |
|--------------------------|--------|-------|
| 面積 ($\mu\text{m})^2$ | 165.91 | 84.46 |
| 長径 (μm) | 20.32 | 6.29 |
| 短径 (μm) | 10.19 | 2.78 |
| 周開長 (μm) | 72.31 | 23.31 |
| 長径/短径 | 2.08 | 0.78 |
| 周開長 ² /面積 | 32.71 | 7.75 |
| 半径の平均 (μm) | 6.91 | 1.58 |
| 半径の分散 ($\mu\text{m})^2$ | 3.66 | 4.57 |

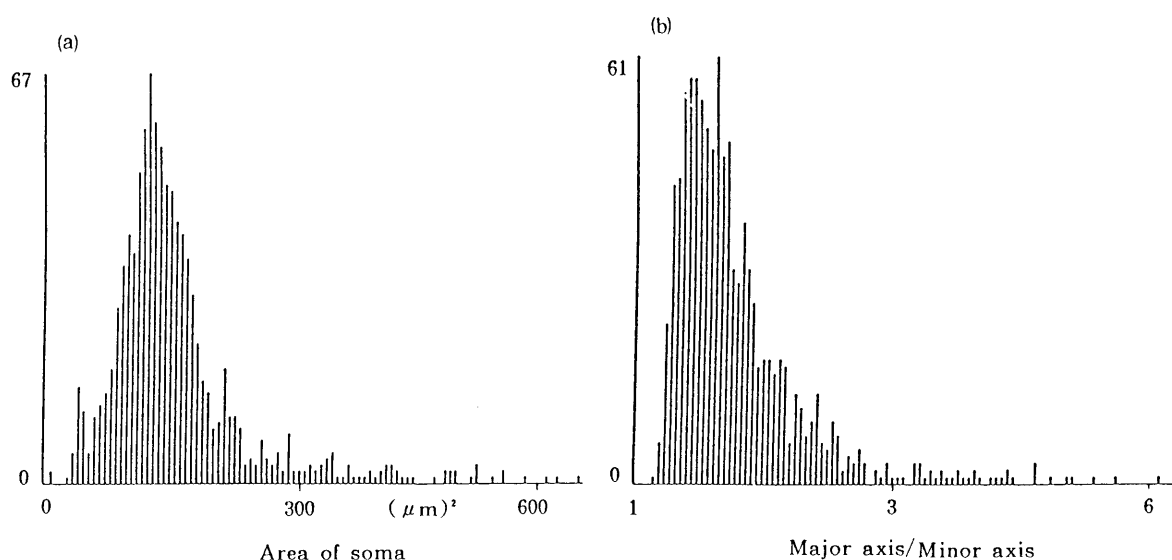


図5-1 ナマズの997個の神経節細胞と20個の双極細胞の形態の特徴量のヒストグラム

(a) 面積 (b) 長径/短径

- (1) 端点：骨格線上で8近傍内の連結点の一つのみの点。ただし、細胞体の尖りに起因する骨格線の端点は樹状突起の端点ではないので、以下の方法により除外した。すなわち、まず細胞像の重心を求め、さらに細胞体の擬似半径 r を細胞像の面積 S を用いて、 $r=(S/\pi)^{1/2}$ と定義し、重心を中心とする半径 $4r/5$ の円内に含まれる端点は樹状突起の端点としては除外した。
- (2) 分岐点：骨格線上の点で8近傍内に三つ以上の骨格線上の点を持つ点。ただし、分岐点の8近傍内に他の分岐点が存在すると分岐点に隣接する端点が探索できない。従って、8近傍内に既に分岐点が存在する場合には、新しい分岐点を既に存在するものと同一のものとして定義した。
- (3) 分岐点における各骨格線の伸びる方向：分岐点とそれに隣接する分岐点あるいは端点とを

第5章 網膜細胞画像の形態に関する特徴抽出

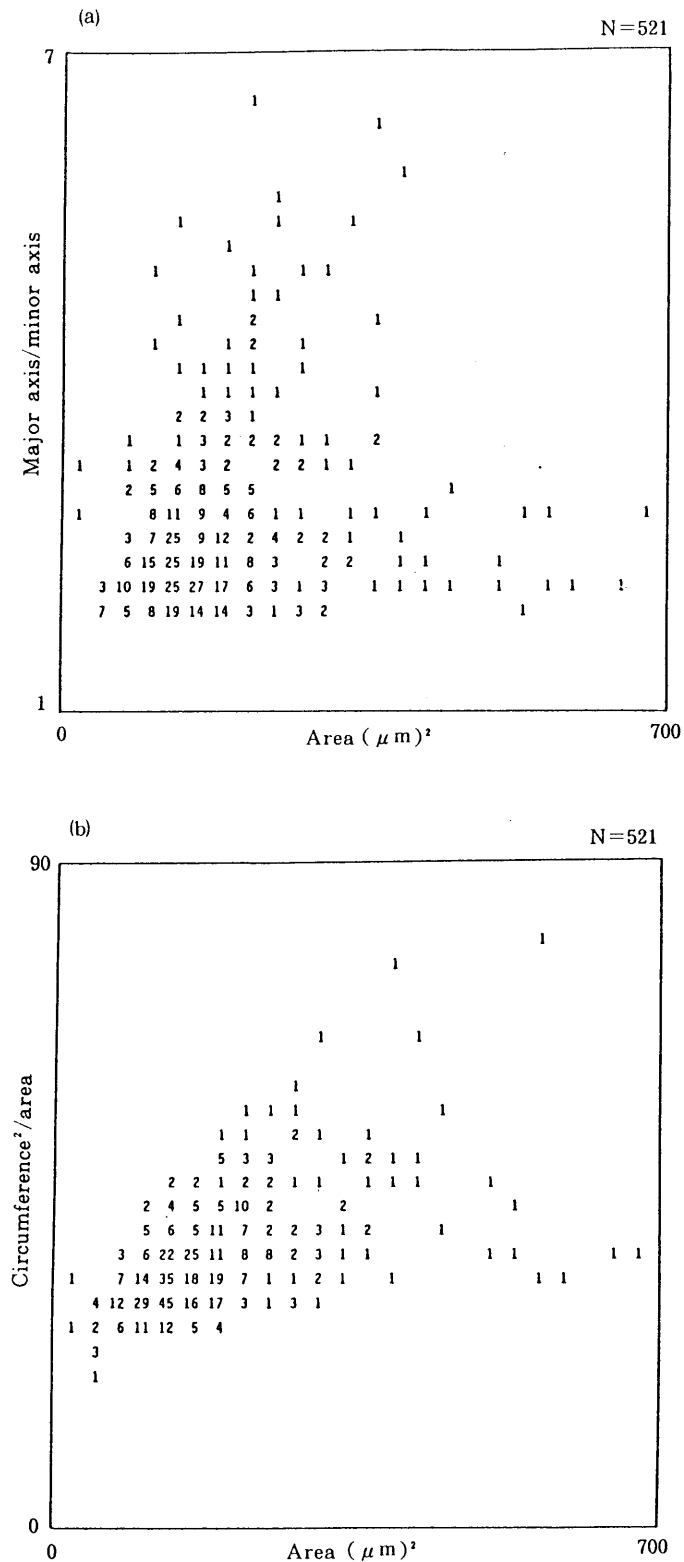


図5-2 ナマズ網膜の神経節細胞521個の形態の特徴量の2次元ヒストグラム

(a) 面積と長径/短径 (b) 面積と周囲長²/面積

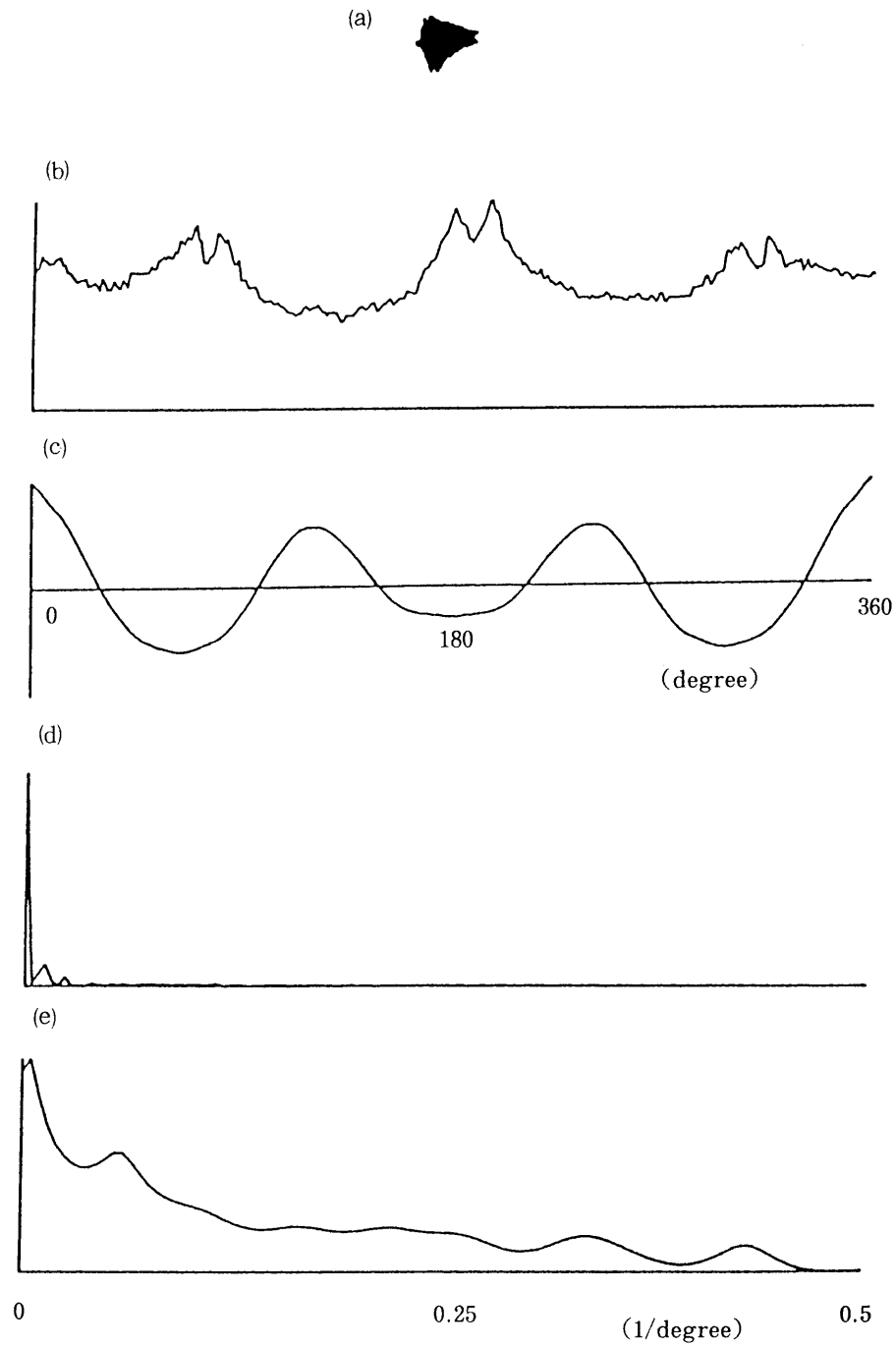


図5-3 細胞体を1次元系列データで表現したときの特徴量の例

(a) 細胞体像 (b) (a)を極座標展開して得た1次元系列データ

(c) (b)の自己相関関数 (d) (b)をフーリエ変換して得たパワースペクトル (e) (b)に自己回帰モデルを当てはめて求めた線形予測係数より推定したパワースペクトル

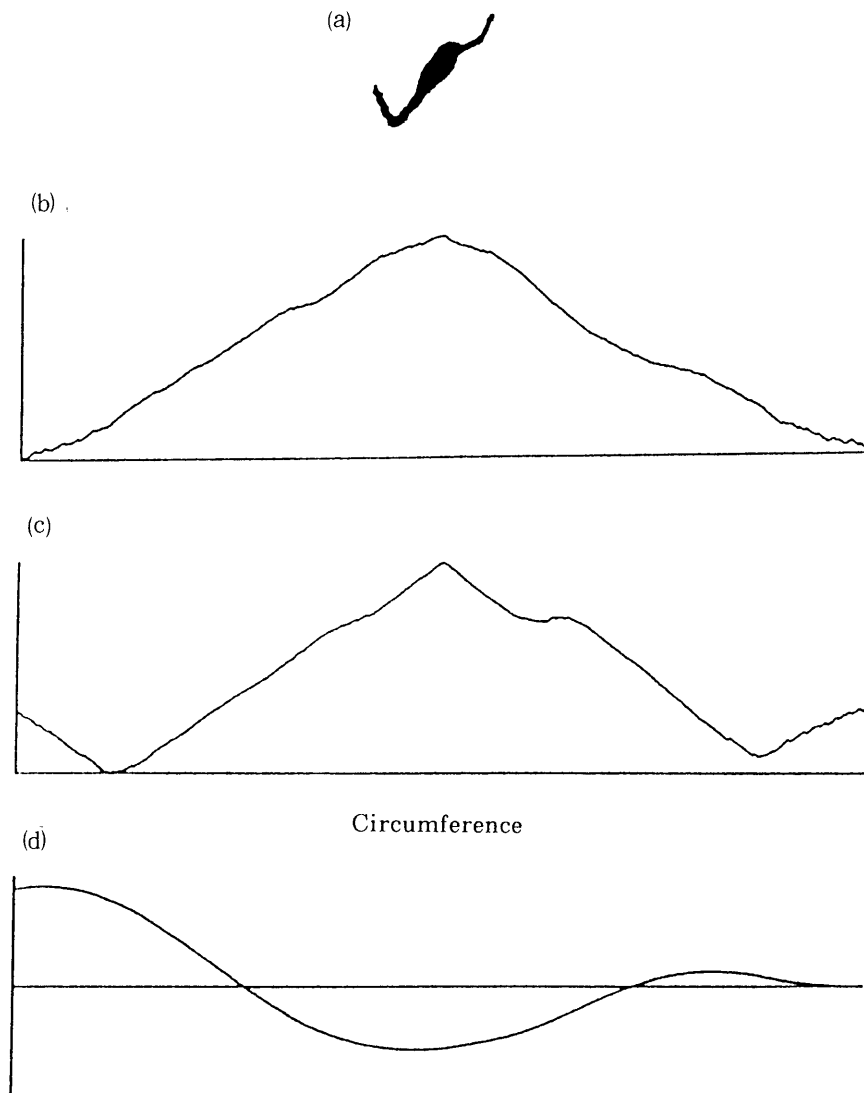


図5-4 細胞体画像を2次元系列データで表現したときの特徴量

(a)細胞体像 (b) (a) の輪郭線を追跡し、その追跡の距離に対し輪郭線の x 座標をプロットした系列データ (c) (a) の輪郭線を追跡し追跡の距離に対し輪郭線の y 座標をプロットした系列データ (d) (b) と (c) の相互相関関数

直線で結び、隣合う線分のなす角度を反時計方向に求めた。突起が2本の場合、細胞画像の重心と2本の突起の端点の3点を折れ線で結び、重心での反時計方向に求めた角度として定義した。

5. 3. 2 樹状突起の形状による細胞像の形態に関する特徴抽出例

ここでは、樹状突起の形状認識の応用例として521個のナマズ網膜細胞における神経節細胞の形態について統計解析を行った結果を示す。ただし、樹状突起の特徴が誤認識されたもの

は、視察による修正を加え、以下に述べる解析を行った。

図5-5は、521個のナマズ網膜の神経節細胞像の主樹状突起の本数のヒストグラムである。樹状突起の本数は、3あるいは4本のものが多く、突起の本数の多い方へ偏った分布形状を示している。また、樹状突起が存在しない細胞は対象群として加えた双極細胞である。

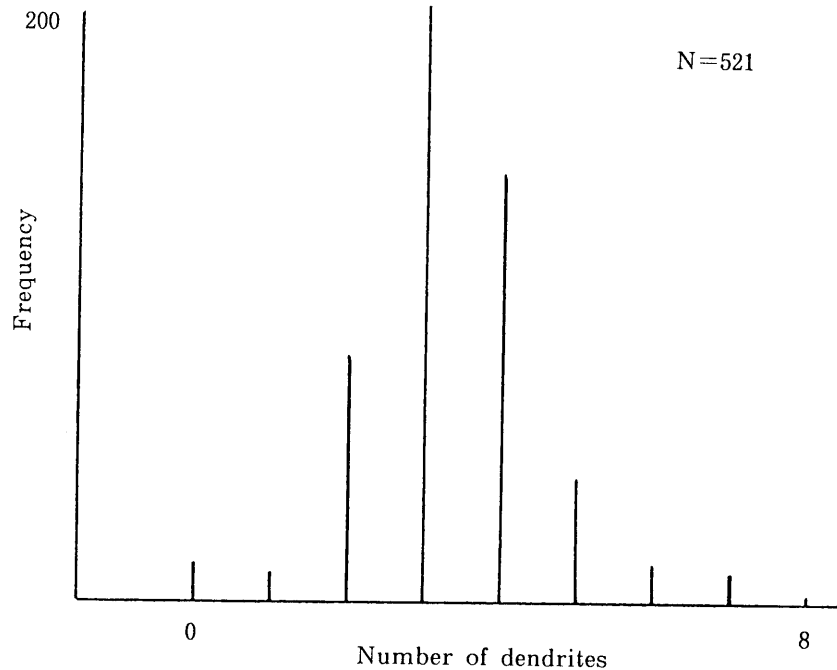


図5-5 521個のナマズ網膜の神経節細胞の主樹状突起の本数のヒストグラム

表5-2は、主樹状突起の本数別に求めた細胞体の形態に関する各種特徴量の平均値と標準偏差を示す。表の各欄の上が平均値、下が標準偏差である。細胞体の面積、短径等細胞体の大きさに関する特徴量は主樹状突起の本数の増加に伴い増大する。また、突起が2本のものと5本以上のものとを比較すると細胞体の面積は約2倍となっている。さらに、細長さを表現する長径/短径に関しては本数との相関はあまりみられない。樹状突起が無い双極細胞では細胞体の面積が小さく、長径/短径の小さい円に類似した細胞体であることが分かる。

図5-6は、ナマズの網膜細胞に最も多く存在する3本の樹状突起を持つ細胞201個に関し、2本の突起のなす角度の最も小さいものと、2番目に小さいものとの二次元ヒストグラムを求めた結果である。図中長方形枠で示すように2箇所分布が集中している。左上のグループ(Aグループ)は、最も小さい角度が50~80°、2番目が120~150°、右下のグループ(Bグループ)は最も小さい角度が80~110°、2番目が100~130°である。すなわちAグループは2本の突起が類似した方向に広がり他の1本がそれらと反対方向に伸びている場合である。Bグループは、3本が等間隔に広がる場合である。各グループの長径/短径のヒストグラムを示したものが図5-7である。(a)がAグループ、(b)がBグループのヒストグラムである。(b)は(a)と比較して、値が1に近いところに集中した分布を示している。このことは、3

表5-2 521個のナマズ網膜の神経節細胞の樹状突起の本数別に求めた細胞体形態の各特徴量の平均値と標準偏差

| 本数 | 面積 (μm) ² | 短径 (μm) | 長径／ 短径 | 周囲長 ² ／ 面積 | 個数 |
|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------|--------------------------|-----|
| 0 | 60.31 72.18 | 6.43 2.65 | 1.67 0.47 | 24.71 5.50 | 13 |
| 1 | 114.62 70.67 | 7.59 2.09 | 2.39 1.07 | 29.50 6.36 | 10 |
| 2 | 133.91 40.17 | 9.33 2.11 | 2.11 0.67 | 30.73 6.55 | 84 |
| 3 | 149.57 58.35 | 9.94 2.29 | 2.03 0.76 | 31.58 6.79 | 201 |
| 4 | 171.94 66.42 | 10.34 2.24 | 2.13 0.88 | 33.89 7.46 | 145 |
| 5 | 238.07 111.55 | 12.2 3.38 | 2.09 0.75 | 36.55 8. | 43 |
| 6 | 290.27 91.02 | 13.04 3.39 | 2.32 0.84 | 39.52 11.95 | 13 |
| 7 | 298. 137.56 | 13.19 4.49 | 2.23 0.59 | 42.78 12.09 | 10 |
| 8 | 636.79 21.71 | 21.28 2.9 | 1.98 0.61 | 34.29 1.01 | 2 |

本の樹状突起が等間隔に広がる細胞像の細胞体は長径／短径が1に近く、細胞体の形状は円に類似していると考えられる。逆に、樹状突起の角度に偏りのある場合は、細長い細胞体が多いことが分かる。

図5-8は、細胞の主樹状突起の本数と細胞体形態の関係を表したもので、1010個の神経節細胞の細胞体の面積と主樹状突起の本数との2次元ヒストグラムである。突起の本数が増加すると、面積が大きくなる傾向にあり、さらに、面積のばらつきも大きくなっている。

図5-9は、次節5.4の図5-11で述べる円、三角形、紡錘形をテンプレートとして、500個の神経節細胞の細胞体と面積の一致度を尺度としたテンプレートマッチングを行い、抽

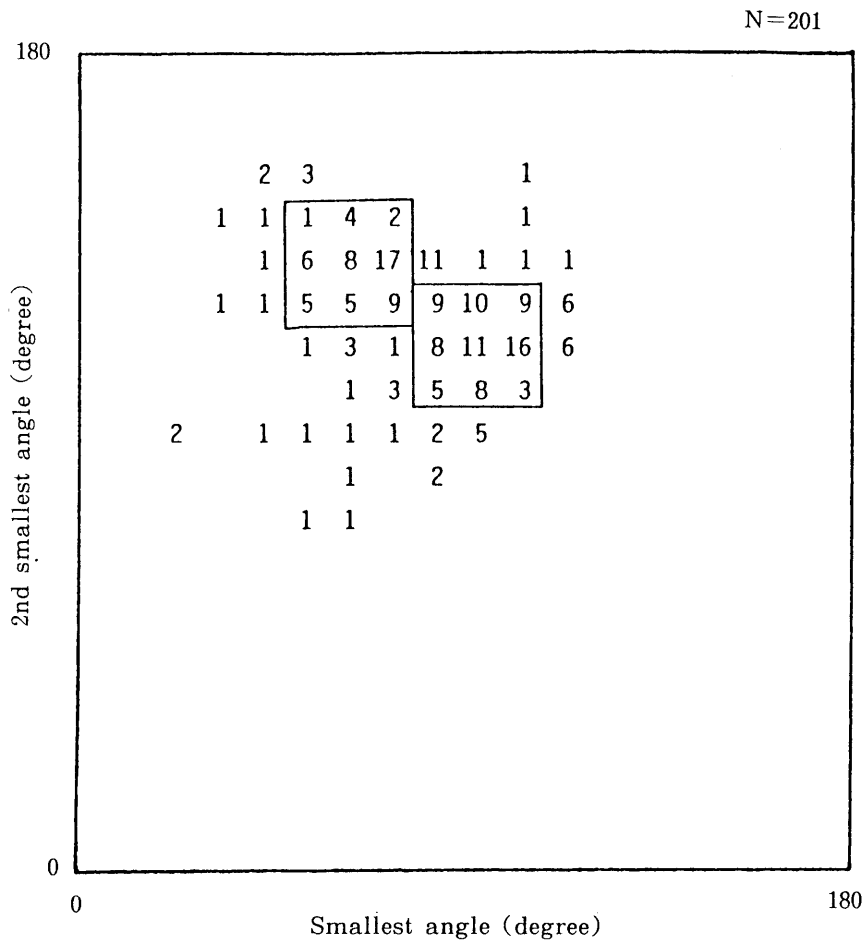


図5-6 ナマズ網膜の神経節細胞の樹状突起が3本のもの201個に対する3本の突起のなす角度に関する解析例。横軸が2本の突起のなす最小の角度、縦軸が2番目に小さい角度を表す。

出した各50個の細胞画像に関して主樹状突起の本数を計数し、そのヒストグラムを描いたものである。この結果から、細胞体の形態により主樹状突起の本数の分布形状の特徴が明確に異なることが分かる。すなわち、細胞体が、円のものは樹状突起の無いものが多い。三角形のものは、その頂点から主樹状突起が伸びているため、3本のものが多い。紡錘形に関しては、突起が2本と3本のものが多い。

次に、複雑な樹状突起形状を持つ細胞像の形態を解析した結果について述べる。対象とした細胞は、ナマズの神経節細胞をゴルジ染色しスケッチしたものである。図5-10(a)に対象とした細胞像を示す。(b)は、構造解析を行うために抽出した(a)の骨格線であり、便宜的に付した分岐点の番号も併せて示している。(c)は、各分岐点の連結関係を解析し計算機によりグラフ表示したものである。表5-3は、この分岐点の位置、分岐点間の連結関係を計算機で自動認識した結果を示す。表で右枠の座標点は、左にある分岐点に隣接する分岐点もしくは端点の座標を表す。例えば、分岐点6(248,238)に隣接する分岐点は8(221,275)と4(200,213)であることを示している。これにより複雑な樹状突起パターンをコード化することが可能となり、このデータを用いた形態解析への応用も考えられる。

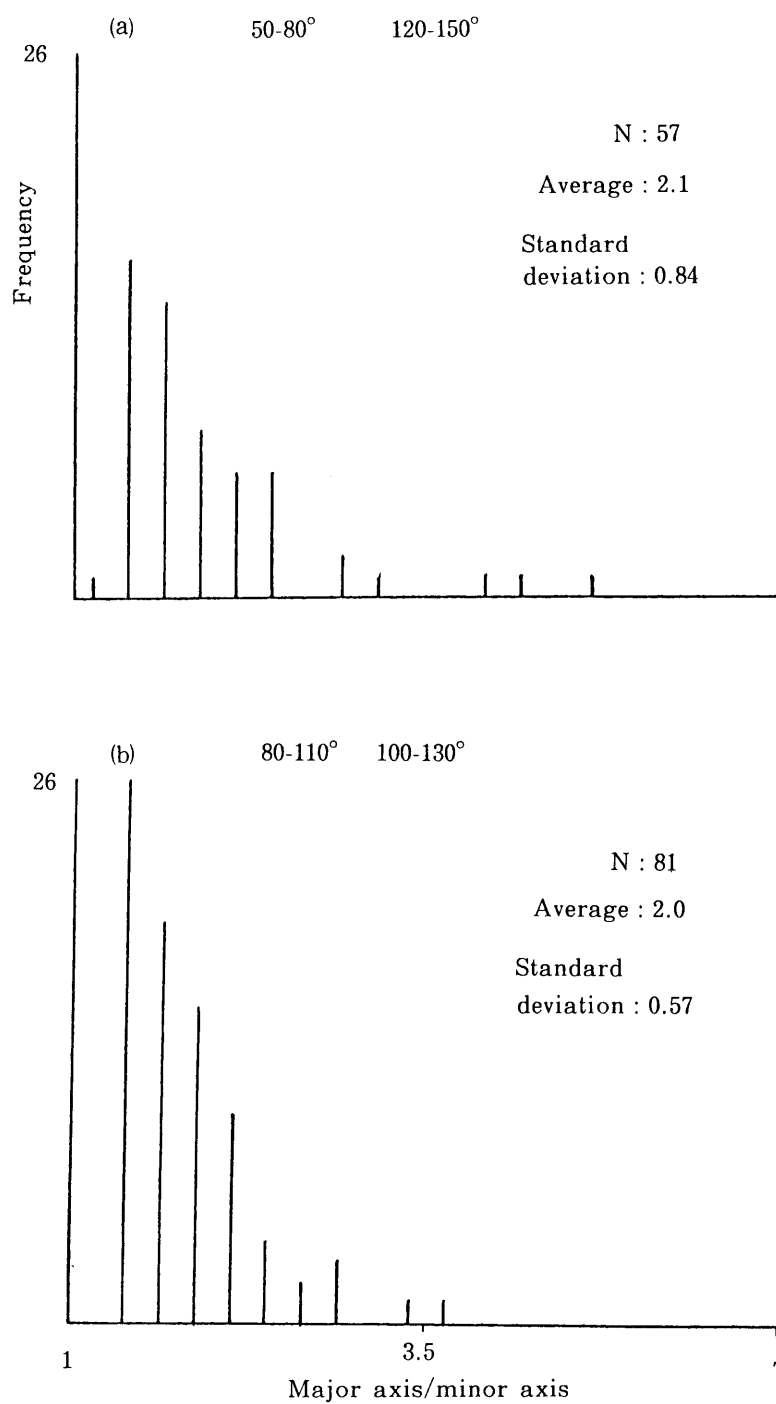


図5-7 3本の主樹状突起のなす角度によるグループ別の長径/短径のヒストグラム

(a) 2本の突起が類似した方向に他の1本がその反対側に伸びる細胞像 (b) 3本の突起が等間隔に広がる細胞像

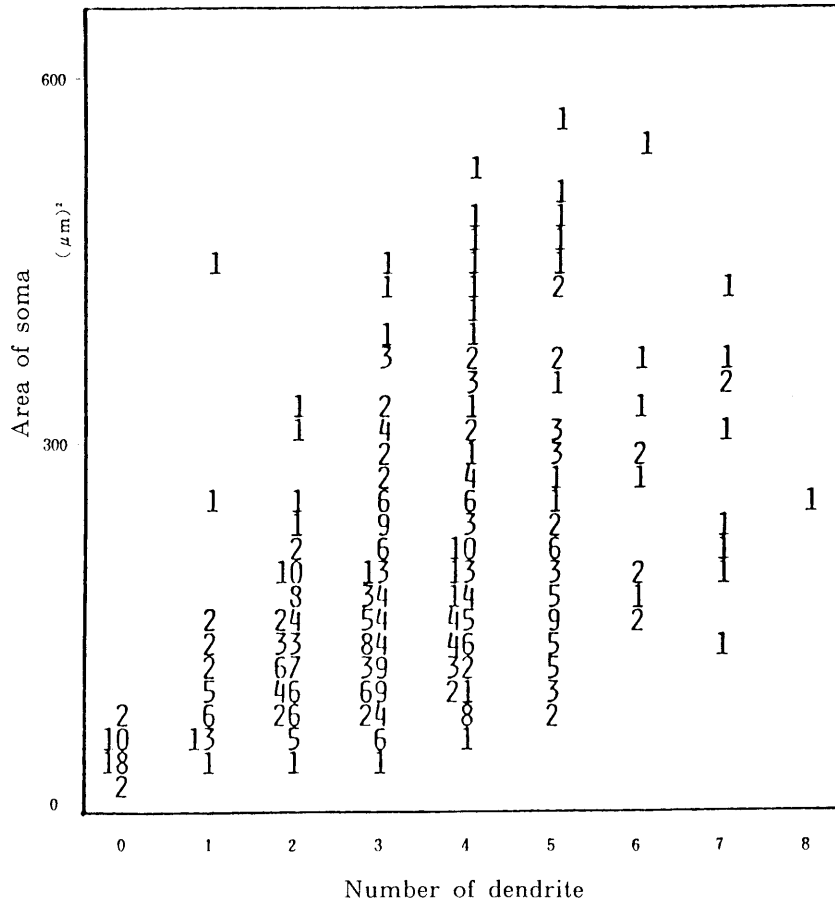


図5-8 ナマズ網膜神経節細胞 1010 個の主樹状突起の本数と細胞体の面積に関する 2 次元ヒストグラム

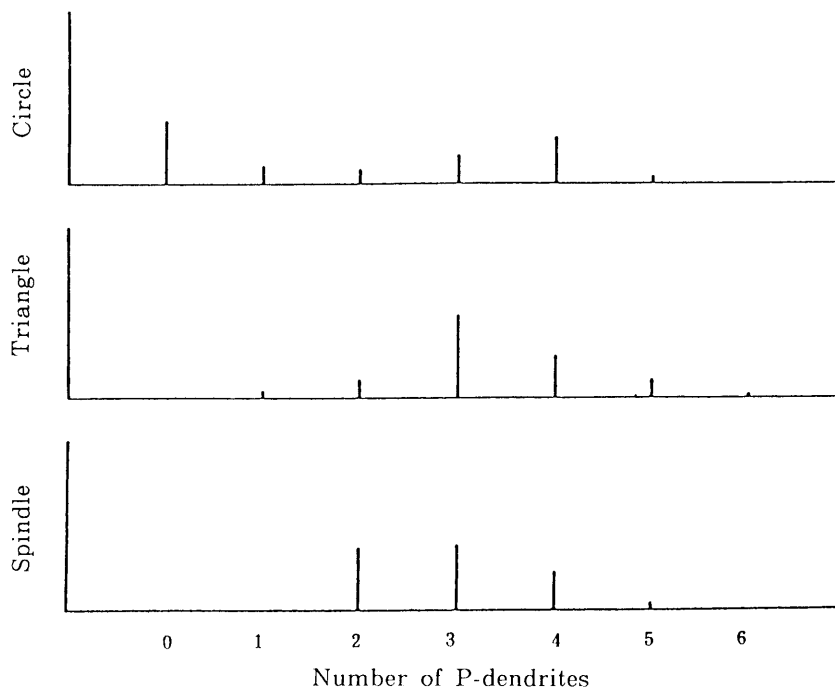


図5-9 細胞体の形態別主樹状突起の本数のヒストグラム。細胞体形態は、スケッチした円、三角形、紡錘形の画像と 500 個の細胞体画像とのテンプレートマッチングを行い類似度の最も大きいものより 50 個抽出した

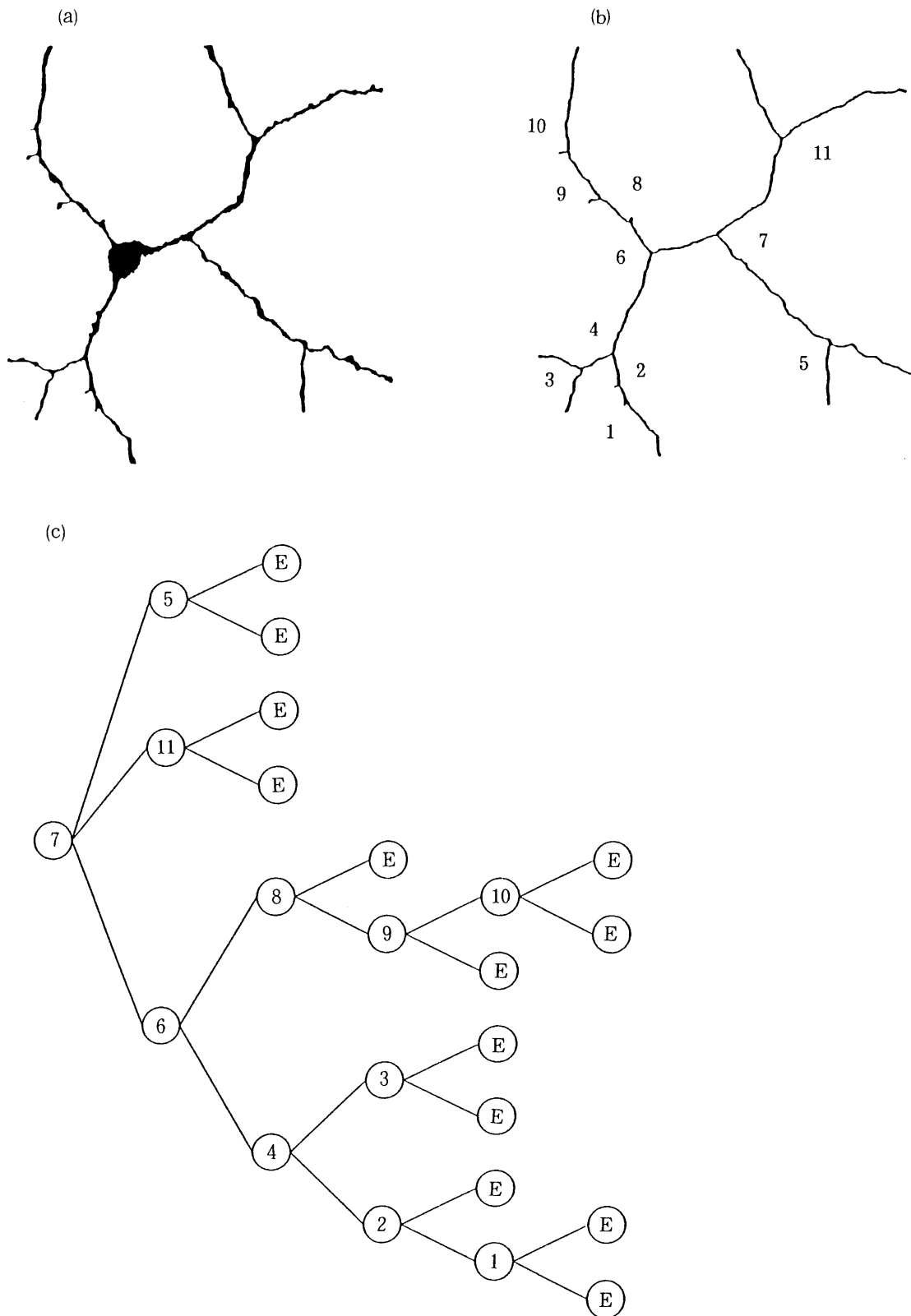


図5-10 複雑な樹状突起形状の特徴抽出例

(a) ナマズ網膜神経節細胞をゴルジ染色した光学顕微鏡のスケッチ画像 (b) (a) を細線化し抽出した骨格線 (c) (b) の分岐点の隣接関係のグラフ表示

表5-3 図5-10における細胞像の樹状突起の分岐点の位置およびその連結関係

| | | | | | |
|-------------|--------------|-------------|-------------|--|-------------|
| 7 (326,259) | 5 (470,134) | (467,64) | | | |
| | | (574,96) | | | |
| | 11 (480,370) | (561,426) | | | |
| | | (352,473) | | | |
| | 6 (248,238) | 8 (221,275) | (224,279) | | |
| | | | 9 (186,302) | | |
| | | (172,298) | | | |
| | | 3 (163,106) | (111,121) | | |
| | | | (144,57) | | |
| | | 4 (200,213) | 2 (208,88) | | (204,85) |
| | | | | | 1 (217,70) |
| | | | (258,6) | | |

5. 4 細胞形態の分類法

ここでは、5. 2、5. 3に述べた細胞の形態に関する特徴量を用いた形態分類の手法について述べる。5. 4. 1では、形態分類における距離尺度である類似度の定義を述べ、5. 4. 2では、形態に基づく検索の手段であるテンプレートマッチング法について、さらに5. 4. 3では、ある母集団の要素を類似度の大きいものから順にグループとしてまとめるクラスタリング法について述べる。

5. 4. 1 形態の類似度の定義

形態分類においては、形態の類似度を数値量として定義する。以下に、類似度の定義を述べ

る。ただし、細胞画像 X の n 個の特徴量を (x_1, x_2, \dots, x_n) 、細胞画像 Y の n 個の特徴量を (y_1, y_2, \dots, y_n) とする。

(1) ユークリッド距離

$$D_{xy}^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2 \quad (5-7)$$

(2) 重み付きユークリッド距離

$$D_{xy}^2 = \sum_{i=1}^n k_i (x_i - y_i)^2 \quad (5-8)$$

ただし $(k_i \mid i=1, 2, \dots, n)$: 各特徴量に対する重み

(3) マハラノビスの平方距離

$$D_{xy}^2 = (x_i - y_i)' \Sigma^{-1} (x_i - y_i) \quad (5-9)$$

ただし $(\quad)'$ は転置行列

Σ は n 個の特徴量の共分散行列

(4) 最尤距離⁽¹²⁷⁾: 細胞形態の特徴量として系列データに自己回帰モデルを当てはめて求める線形予測係数を用いた場合

$$D_{xy} = c_1 + \log[(b_x r_x)/(a_y r_y)] + c_2 + \log[(b_y r_y)/(a_x r_x)] \quad (5-10)$$

ただし $c_1 = \log(a_x a_x)$ $c_2 = \log(a_y a_y)$

a_x : X から得られた系列の線形予測係数

a_y : Y から得られた系列の線形予測係数

a : (a_1, a_2, \dots, a_p)

b : $(1, b_1, b_2, \dots, b_p)$

$b_i = 2 \sum_{j=1}^p a_j a_{j+i} / aa$

r : $(v_1/v_0, v_2/v_0, \dots, v_p/v_0)$

v : 系列の自己相関関数ベクトル

(5) 2次元平面上での画像の重ねあわせ : 画面内で2つの細胞画像の重心点を求める。双方の重心を一致させる。細胞像 X の面積を S_X 、細胞像 Y の面積を S_Y とし、2つの細胞の重なり部分の面積を S_{XY} とする。重なりをの度合を $D_{XY}(\theta)$ と定義する。

$$D_{XY}(\theta) = 2S_{XY}/(S_X + S_Y) \quad (5-11)$$

$D_{XY}(\theta)$ を一方の細胞を固定し、他方を重心を中心に一定角度間隔で回転させ複数個求める。

類似度の尺度 D_{XY} は、(5-12)で示すように $D_{XY}(\theta)$ の最大値で定義する。

$$D_{XY} = \text{Max}(D_{XY}(\theta)) \quad (5-12)$$

(6) 1次元の系列データを用いた重ねあわせ : 細胞体画像の類似度の定量化であるが、細胞体画像を極座標展開し1次元系列データへ変換する。2つの細胞の系列データを $\{r_{xi} \mid i=1, 2, \dots, 360/\Delta t\}$ 、 $\{r_{yi} \mid i=1, 2, \dots, 360/\Delta t\}$ とする。

$$D_{XY}(\theta) = 2 \sum_{i=1}^{360/\Delta t} r_{XYi} / (\sum_{i=1}^{360/\Delta t} r_{Xi} + \sum_{i=1}^{360/\Delta t} r_{Yi}) \quad (5-13)$$

$$D_{XY} = \text{Max}(D_{XY}(\theta)) \quad (5-14)$$

r_{xyi} : $\text{Min}(r_{xi}, r_{yi})$; $\text{Min}(A, B)$ は A, B の大きいものを表す

$D_{xy}(\theta)$: 一方を固定し、他方を一定間隔で平行移動させて求めた重ねあわせ度

このようにして求めた一致度と(5)で述べた一致度と同じ意味付けがなされることが望ましい。(5-13)式において $\Delta t \rightarrow 0$ とした時の極限では、級数が積分となり2つの画像の重心を一致させているため Σr_{xyi} , Σr_{xi} , Σr_{yi} は何れも線積分となり、かつ(5-11)式における S_{xy} , S_x , S_y と一致する。実際には、 $\Delta t = 0$ ではないが十分小さな値をとれば、(5)と(6)の一致度には、大きな相違は現れなかった。(5)と(6)を比較すると(5)においては、重なり具合 $D_{xy}(\theta)$ を、図形を回転させながら複数個求めるため図形の回転移動を伴うが、(6)においては同一の処理が角度方向への平行移動で行えるため、計算時間が10分の1以下に短縮できた。さらに、(5-11)式において大きさを変更したり、グループにおいて大きさを正規化する操作は、2次元座標で行うため煩雑で計算時間がかかる。しかし、これを(6)の手法で行うには、極座標展開した各値を一定値で除す操作を行うのみであるので、簡略で計算時間がかからない。従って、大きさには依存せず形状のみ比較を行えばよいという点において(6)の手法が有利である。

5. 4. 2 テンプレートマッチング法

形態に関してある基準の細胞画像と、ある集団の細胞画像との類似度の大きいものから検索する手法。基準となる画像は細胞画像でなく人工的に作成した図形でもよい。

図5-11は、テンプレートマッチングの例として、図左端の3個の円、紡錘形、三角形を描き、その図形と500個のナマズ網膜神経節細胞の細胞体との類似度を計算し、類似度の大きいものから順に20個ずつテンプレートの右に並べたものである。類似度は、5. 4. 1の(6)に述べた細胞体を重心から輪郭線までの距離と角度で極座標表示した1次元の系列データの一致度をもってした。大きさに関しては、極座標展開した値を半径の最大値で除しているため正規化されている。極座標展開は1度間隔で行い、角度方向へは、10度ずつ移動して一致度を計算した。この結果、画像の傾きや大きさに依存せず大略テンプレートと類似した細胞体が抽出されている。このように、検索する形態を特徴付ける図形を人工的に作成し、それとのテンプレートマッチングを行うことで、画像の検索が可能となる。

次に、テンプレートマッチングによる検索と、人が検索を行った場合の比較を行った。60個の細胞体像を25名の被験者に示し、各細胞の形に関し、円、半円、紡錘形、三角形あるいは、それ以外という判定をさせた。その結果、最も多数の被験者が例えば円と判定した図形を円のテンプレートとしテンプレートマッチングを行った。距離尺度には、5. 4. 1の(6)に述べた極座標展開した1次元系列の一致度を用いた。その結果を表5-4に示すが、テンプレートの図形に対し被験者の過半数がその図形と判定したものを人が分類した数として示した。図形の判定に関しては重複解答を許したため総計は60個を越えている。テンプレートマッチングにおいては、各テンプレートにおいて人が分類した数だけ類似度の大きいものから順に検

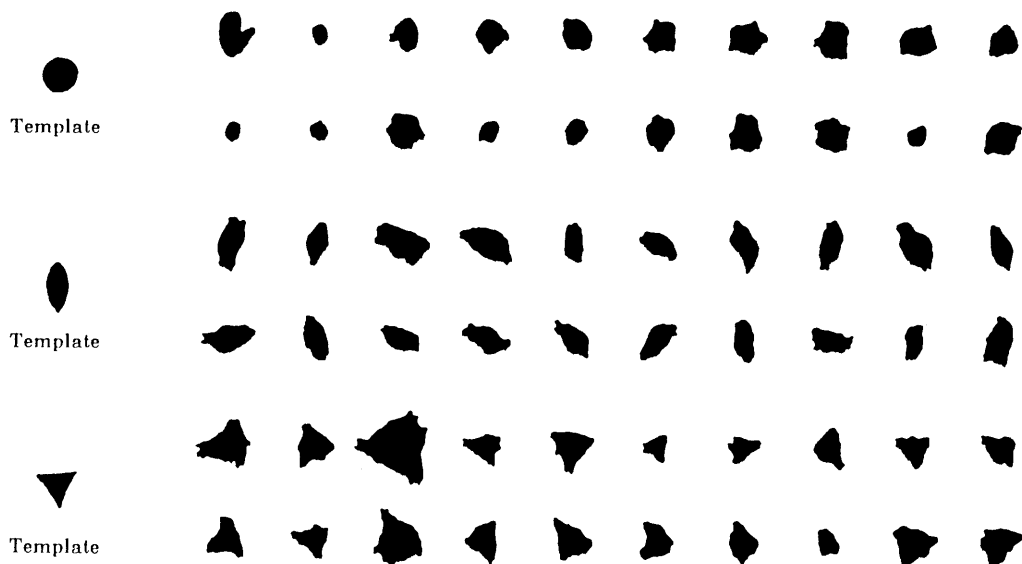


図5-11 円，紡錘形，三角形のスケッチ画像と500個のナマズ網膜神経節細胞とのテンプレートマッチングの結果。テンプレートと細胞体画像を極座標展開して，1次元系列データとしての重ね合わせを類似度の尺度とし，類似度の大きいものより20個抽出した結果

索した。その結果，検索された細胞と過半数の被験者が判定した細胞とが一致したものの数を一致した数の欄に示す。一致率は，紡錘形が最もよく68%であった。この結果，重ね合わせの一致度を尺度としているため，視覚的判断において顕著な特徴となる角の数，角の鋭さ等は，一致度においての寄与が少ない。これらが，人が分類した結果との相違の一因と考えられる。

図5-12は，テンプレートとして左の4つの細胞体を用い，特徴量として，極座標展開した1次元系列をフーリエ変換して求めたパワースペクトルを用いたテンプレートマッチングの結果である。パワースペクトルは，128点求め，類似度の距離尺度は，128次元の特徴量空間内でのユークリッド距離とした。500個の細胞体画像を用いた結果について，最も類似度の大きいものから20個をテンプレートの右に並べたものである。この結果より，大きさには依存せず形状のみを用いた検索結果となっている。

図5-13は，テンプレートとして左の4つの細胞体を用い，極座標展開した1次元系列の自己相関関数を特徴量としたテンプレートマッチングの結果である。類似度の距離尺度には，

表5-4 細胞体画像に関する分類結果と計算機による分類結果の比較

| テンプレート | 人が分類した数 | 一致した数 | 一致率 |
|--------|---------|-------|------|
| 円 | 20 | 10 | 0.5 |
| 半円 | 14 | 4 | 0.29 |
| 紡錘形 | 31 | 21 | 0.68 |
| 三角形 | 10 | 4 | 0.4 |



図5-12 500個のナマズ網膜の神経節細胞を対象としたテンプレートマッチングの結果。特徴量は、細胞体を極座標展開して求めた1次元系列データをフーリエ変換して求めたパワースペクトル。極座標は、256点で展開し、128個のパワースペクトルを特徴量とし、類似度の尺度としてユークリッド距離を用いた。

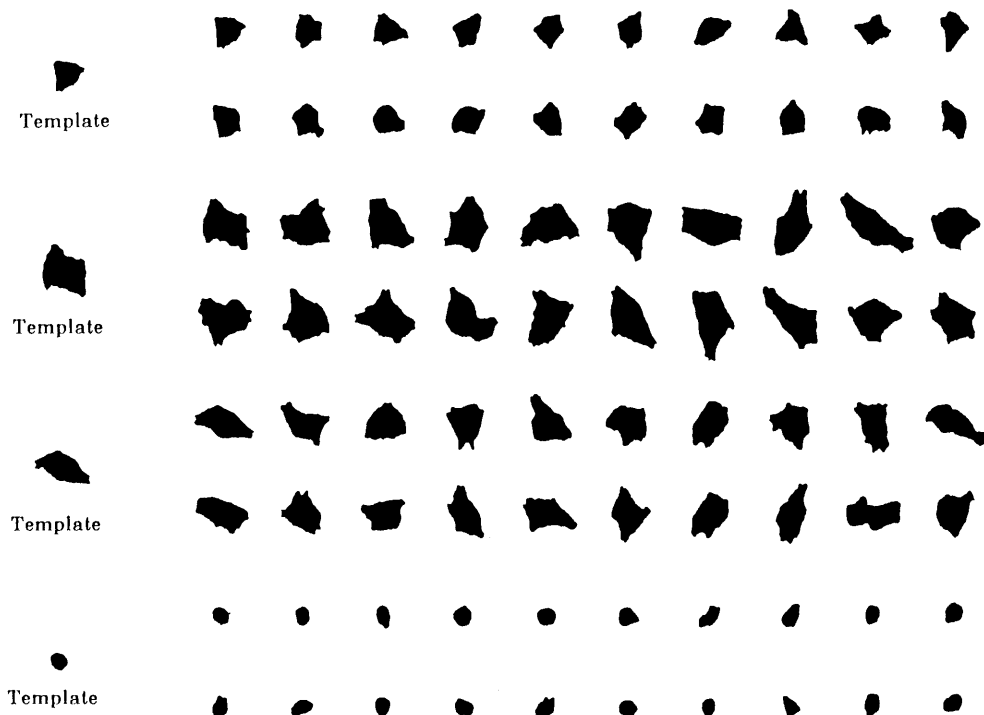


図5-13 500個のナマズ網膜の神経節細胞を対象としたテンプレートマッチングの結果。特徴量は、細胞体を極座標展開して求めた1次元系列の自己相関関数。類似度は、特徴量空間内のユークリッド距離。

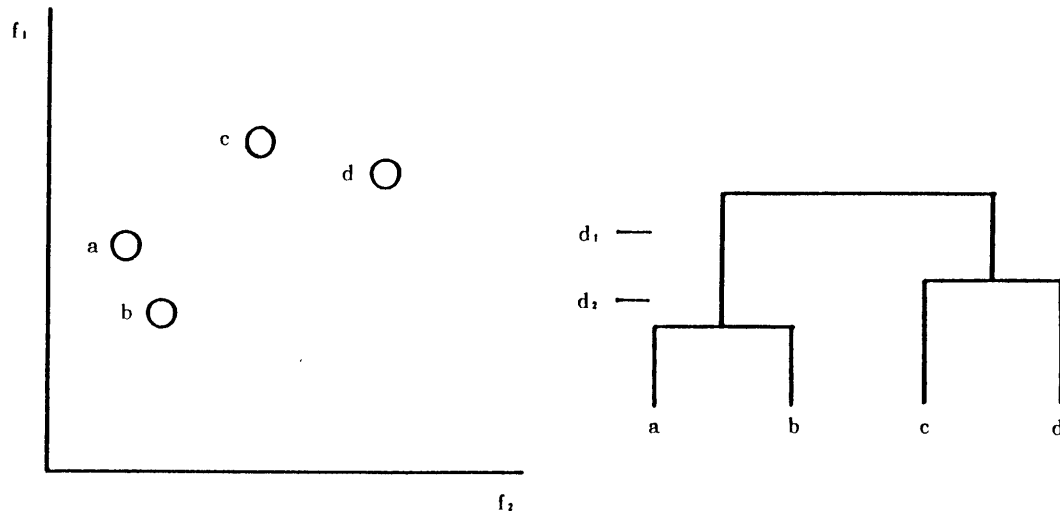


図5-14 クラスタリングにおける分類手続きの概略図

(a) 2次元の特徴量空間 (b) クラスタリングの結果得られた樹形図

特徴量空間のユークリッド距離を用いている。この結果、この分類法では、テンプレートと大きさ、形ともに類似したものを検索していることが分かる。

5. 4. 3 クラスタリング法

クラスタリングとは、全体の中で類似度の大きいものはまとめ、まとめたグループ間は互いに遠ざける分類法である。手法は、まず特徴量空間内で最も類似度の大きな2つの細胞像を1つのグループとする。グループと1つの細胞、細胞間の類似度を計算し、最も大きいものから順にグループとしてまとめる操作を繰り返す。図5-14に、簡単な例を概略図で示すが、(a)は2次元の特徴量空間を表し、 $a \sim d$ は、その空間内での4つの細胞の座標を表現する。この例では、 a と b の距離が最小であるので、類似度が最大となり、まず ab で1つのグループが形成される。次に、 ab と c 、 ab と d 、 c と d の類似度を比較すると cd が最小となり、次に cd というグループが形成される。最後に、 ab と cd を1つのグループとして全体をまとめることができる。この処理過程は、(b)に示す樹形図として表現できる。また、分類は、この樹形図を設定した高さで切断することにより実現できる。例えば(b)を d_1 の高さで切断すれば ab と c と d の3グループに分類できるし、 d_2 の高さで切断すれば ab と cd の2グループに分類できる。

次に、クラスタリングの処理途中において、新グループを構成する際、そのグループと既存のグループあるいは細胞との距離について述べる。距離は、以下の4つで定義した。各距離の定義式も同時に示すが、いずれも新しいグループを作成する時点での既存のグループあるいは細胞との距離に関しては、グループが構成される直前における新しいグループを構成した2つのグループあるいは細胞とそれ以外のグループ等の距離を用いて再帰的に定義している。以下の定義式において、新しく構成されたグループを g とし、 g はグループ h と l が融合したとす

る。融合前のグループ f と h あるいは f と l の距離を D_{fh} , D_{fl} とし、新しいグループ g と f との距離を D_{fg} とする。

- (1) 最短距離法：グループに含まれているもっとも近い構成要素間の距離。この方法は、グループの融合により特徴量空間が濃縮されるため分類感度は低い。

$$D_{fg} = (1/2)D_{fh} + (1/2)D_{fl} - (1/2) |D_{fh} - D_{fl}|$$

$$= \begin{cases} D_{fl} & (D_{fh} \geq D_{fl} \text{ のとき}) \\ D_{fh} & (D_{fh} < D_{fl} \text{ のとき}) \end{cases} \quad (5-15)$$

- (2) 最長距離：各グループに含まれているもっとも遠い構成要素間の距離。グループに融合しない部分が融合した部分から離れる特徴量空間の拡散が起こるため分類感度が高い。

$$D_{fg} = (1/2)D_{fh} + (1/2)D_{fl} + (1/2) |D_{fh} - D_{fl}|$$

$$= \begin{cases} D_{fh} & (D_{fh} \geq D_{fl}) \\ D_{fl} & (D_{fh} < D_{fl}) \end{cases} \quad (5-16)$$

- (3) 重心距離：各グループに関し、特徴量空間内でその重心位置をもとめ、重心間の距離をグループ間の距離として定義する。各グループに含まれる要素数が異なる時、要素数も考慮にいられた距離。

$$D_{fg}^2 = (n_h/n_g)D_{fh}^2 + (n_l/n_g)D_{fl}^2 - (n_h/n_g)(n_l/n_g)D_{hl}^2 \quad (5-17)$$

- (4) 平均距離：グループ f と g に含まれる全構成要素間の距離の平均値として定義する。特徴量空間内での密度を不変とし、空間が濃縮されたり拡散されたりしない。

$$D_{fg}^2 = (n_h/n_g)D_{fh}^2 + (n_l/n_g)D_{fl}^2 \quad (5-18)$$

図5-15は、60個の細胞体に関して長径/短径、長径と短径のなす角度、および周囲長²/面積の3つの特徴量を求めて特徴量空間内におけるユークリッド距離を用いてクラスタリングを行った結果である。クラスタリングの過程におけるグループの融合距離には平均距離を用いている。図はグループの融合過程を表す樹形図の一部を示しているが、距離の小さい箇所で融合されているものは類似度が大きいことを示す。対象とした細胞には、各種の形態が含まれているが、図に示した部分は紡錘形の形態のものによりグループが構成されている。

図5-16は、500個の細胞体に関して、極座標展開した1次元系列の自己相関関数を求め、クラスタリングを行った結果である。自己相関関数は、90度まで求め、特徴量空間内のユークリッド距離を類似度の尺度とした。また、グループの融合距離には平均距離を用いている。図においては、クラスタリングの過程を表す樹形図の一部を示す。視覚的に類似しているものが距離の小さい位置でグループとしてまとめられていることが分かる。

図5-17は、100個の細胞体に関する面積と長径/短径より求めた2次元特徴量空間内で

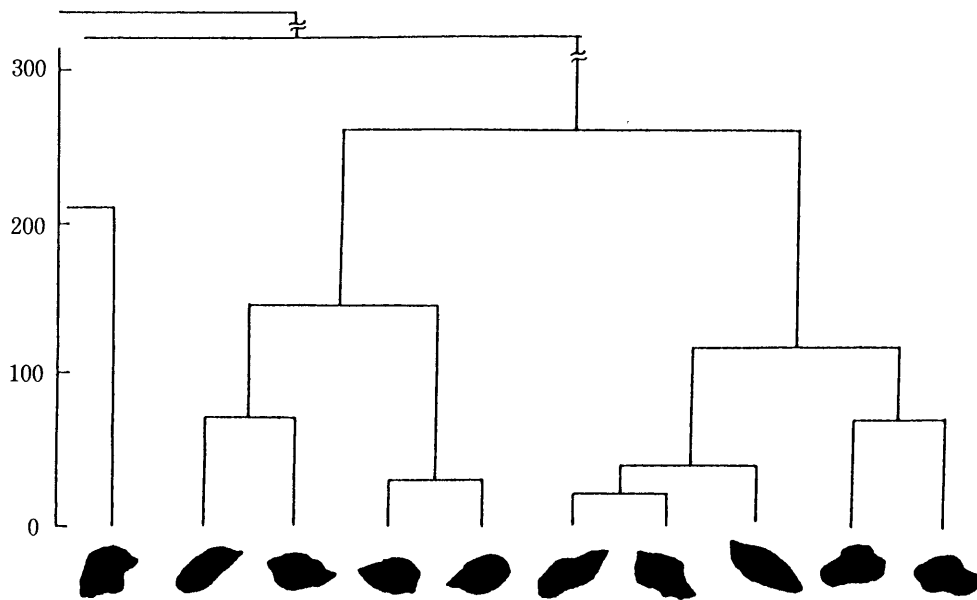


図5-15 60個の細胞体像に関して長径／短径，長径と短径のなす角度，および周囲長²／面積をもとめ特徴量空間内のユークリッド距離によってクラスタリングを行った結果

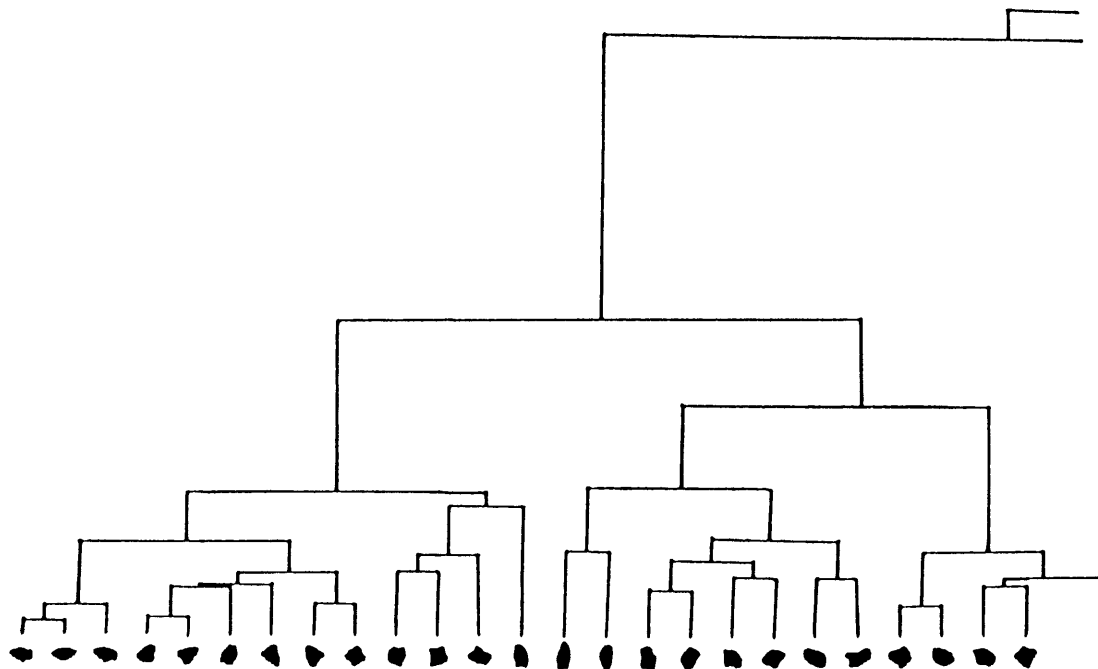


図5-16 500個の細胞体像を極座標展開して求めた1次元系列の自己相関関数を求めクラスタリングを行った結果描いた樹形図の一部

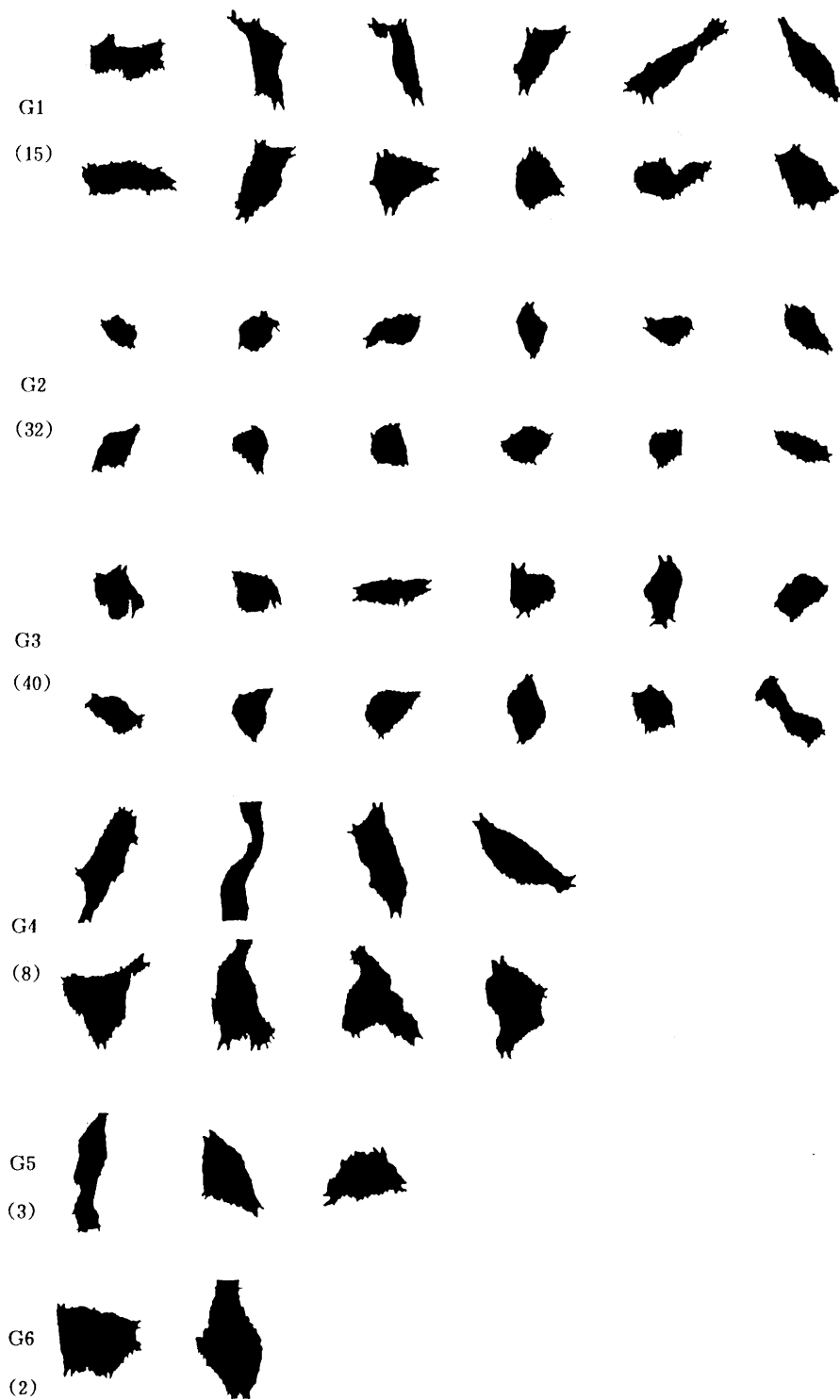


図5-17 100個の細胞体像に関し求めた面積と長径／短径を用いクラスタリングを行い、細胞体像の分類を行った例。グループの融合には、最長距離を用い、特徴量空間内の全要素が1つに融合された距離を100とした時、距離が20において樹形図を切断したときのグループわけの状態

のユークリッド距離によるクラスタリングの結果である。グループの融合距離には、最長距離を用いている。グループの融合を繰り返し、全てが1つにまとめられる距離を100としたとき、距離が50におけるグループ分けの様子を示したものである。6つのグループが存在した。グループ名 G_i の下に()で示した数はグループの構成要素数を示す。構成要素の多いものは、その一部を図示している。このグループ分けにおいては、細胞体の面積の小さいもので2つのグループ (G_2, G_3) が構成されている。 G_2 は比較的丸みを帯びたもの、 G_3 は細長いものから構成されていることが分かる。 G_4, G_5, G_6 は、かなり大きい細胞体から構成されたグループである。この結果よりナマズの神経節細胞において、大きさの小さいものは比較的形状の類似したものが多く、個数も多い。それに比して、大きいものは少数だが形態のばらつきが大きいことが分かる。

5. 5 多変量解析による細胞形態解析

ここでは、特定生物の細胞形態の特徴付け、あるいは、他生物の細胞との形態比較を行うため、形態に関する特徴量を用いて多変量解析を行うが、その手法について述べる。

5. 5. 1 主成分分析法

主成分分析とは、1つの細胞に関する複数個の特徴量の持つ情報を、少数個の主成分に要約することである。 p 個の特徴量を (x_1, x_2, \dots, x_n) とし、 m 個の主成分に集約できるとすると、特徴量と主成分の関係は(5-19)で表現できる。

$$\begin{cases} f_1 = l_{11}x_1 + l_{12}x_2 + \dots + l_{1n}x_n \\ f_2 = l_{21}x_1 + l_{22}x_2 + \dots + l_{2n}x_n \\ \vdots \\ f_p = l_{p1}x_1 + l_{p2}x_2 + \dots + l_{pn}x_n \end{cases} \quad (5-19)$$

ここで、 l_{ij} は主成分 $f_1 \sim f_p$ が互いに独立となるように定められる。主成分($f_1 \sim f_p$)は、特徴量の相関行列 R の固有値として求められる。 l_{ij} は、固有値 f_i に対する n 個の固有ベクトルとして求められる。また、特徴量全体に対する主成分の累積寄与率は、 $(\lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_m)/p$ となる。従って、最初の m 個の主成分を採用し、累積寄与率が十分大きくなれば、 m 個までの主成分で特徴量全体が表現できる。すなわち、特徴量の数のデータ圧縮が可能となる。負荷量の相関係数は、因子負荷量と呼ばれ、各特徴量に対する主成分の寄与率を表す。また、この値から各主成分の意味付けを行うことも可能となる。次に、各主成分を求めた後各細胞を主成分で表現したときの値は、(5-20)式で表す主成分得点として表せる。これは、各細胞を各々互いに独立な特徴で記述したときの値である。

$$\begin{aligned} z_{ik} &= l_{1k}x_{i1}^* + l_{2k}x_{i2}^* + \dots + l_{pk}x_{ip}^* \\ x_{ij}^* &= (x_{ij} - x_j)/s_j \end{aligned} \quad (5-20)$$

第5章 網膜細胞画像の形態に関する特徴抽出

<特徴量>

| | |
|---------------|---|
| 細胞体 (直交座標) | 角の数, 短径, 長径, 面積, 周囲長, 長径/短径 周囲長 ² /面積, 半径の平均, 半径の分散 |
| 細胞体 (極座標) | 自己相関関数 (ACR(1)~ACR(10)), 自己回帰モデルあてはめによるパワースペクトル (PS(1)~PS(10)), フーリエ変換によるパワースペクトル (F(1)~F(10)) |
| 主樹状突起 | 本数 |

<相関行列の固有値>

| | | | | | | | |
|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| 1 | 27.78 | 2 | 5.94 | 3 | 1.36 | 4 | 0.97 |
|---|-------|---|------|---|------|---|------|

<因子負荷行列>

| | 因子 1 | 因子 2 | 因子 3 | 因子 4 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 角 の 数 | 0.051 | 0.58 | 0.28 | 0.49 |
| 主樹状突起の数 | 0.019 | 0.76 | 0.22 | 0.44 |
| 短 径 | 0.6 | 0.7 | 0.32 | 0.11 |
| 長 径 | -0.29 | 0.94 | 0.1 | -0.67 |
| 長径 / 短径 | -0.8 | 0.028 | -0.31 | -0.38 |
| 面 積 | 0.26 | 0.91 | 0.27 | 0.02 |

<共通因子の構成要素>

| | |
|------|--|
| 因子 1 | 長径/短径, ACR(1)~ACR(10), F(3), F(5), F(9) |
| 因子 2 | 主樹状突起の数, 短径, 長径, 面積, 周囲長, 半径の平均, 半径の分散 |
| 因子 3 | F(4), F(6) |

表 5 - 5 1000 個の細胞体を対象に形態に関する 40 個の特徴量を用い主成分分析を行った結果. 各共通因子に含まれる特徴量, 因子負荷行列の一部を示す

ただし、第 k 主成分に対する主成分得点を z_{ik} とし x_{ij}^* は、 i 番目の細胞の j 番目の特徴量を表し、 x_j は、 j 番目の特徴量の対象細胞の平均値、 s_j はその標準偏差を表す。

表5-5は、1000個の細胞体を対象に、主樹状突起の本数、細胞体の面積、長径等、表の特徴量の欄に記述した40個の特徴量で主成分分析を行った結果である。表の固有値は、40個の特徴量から計算した相関行列の固有値において、寄与率が80%以上のもの4個を示したものである。表の因子負荷行列は、因子負荷行列の一部を示し、共通因子は3つの共通因子に含まれる特徴量を列挙したものである。この結果より、因子1は、細胞体の輪郭線の変動の大きさを表す特徴量で、因子2は、細胞の大きさを表す特徴量から構成されていることが示唆された。

図5-18は、表5-5で示した主成分分析の結果を、実際の形態分類に応用したものである。(a)は、図の左に示す4つのテンプレートと、他の60個の細胞体との間で、表1の因子1の欄に示した、長径/短径等の特徴量の差の平方和を計算し、それぞれ最も小さい細胞体より10個取り出した結果である。(b)は、表1の因子1と因子2に含まれる特徴量に基づく分類であり、(c)は表1の因子1、因子2、因子3の欄に書かれている全特徴量に基づく分類である。この結果、(a)には細胞体の大きさに関する特徴量は含まれないが、(b)にはそれが含まれているため、形に加え大きさも類似した細胞が選択され、総合的には分類精度が良くなっている。しかし、(b)には大きさの要素が加わったため、輪郭線の形状に関する情報が相対的に減少している。また(b)と(c)が同じ分類結果となったのは、因子3の欄の特徴量は、固有値の値が小さく分類に対する寄与率が小さいためと思われる。

5. 5. 2 判別分析法

あらかじめグループ分けされた細胞群に対し、新しい細胞が何れのグループに含まれるかを判別分析法により判定した。まず、2つのグループが存在する場合を考える。グループを G_1 , G_2 とし、判別の対象とする細胞を x_i とする。特徴量空間において各グループの重心と対象細胞とのマハラノビスの平方距離 D_{01}^2 , D_{02}^2 を求める。

$$\begin{aligned} D_{01}^2 &= \sum_i \sum_j V_{ij} (x_{0i} - x_i^{(1)}) (x_{0j} - x_j^{(1)}) \\ D_{02}^2 &= \sum_i \sum_j V_{ij} (x_{0i} - x_i^{(2)}) (x_{0j} - x_j^{(2)}) \end{aligned} \quad (5-21)$$

ただし V_{ij} は特徴量の相関行列、 $x_i^{(1)}$ は、 G_1 の構成要素の i 番目の特徴量の平均値である。判別に関しては、

$$D_{01}^2 > D_{02}^2 \quad \text{のとき} \quad x \in G_2$$

$$D_{01}^2 < D_{02}^2 \quad \text{のとき} \quad x \in G_1$$

D_{01}^2 , D_{02}^2 とともに $\chi^2(p; 0.05)$ を越えるとき5%の有意水準で x は G_1 にも G_2 にも属さないといえる。

3個以上のグループに関する判別分析についても、同様に、特徴量空間において各グループ

における重心点と判別対象とする細胞のマハラノビスの平方距離を計算し、その最小なグループに属すると判別する。また、いずれのグループにおいても重心からの距離がすべて $\chi^2(p; 0.05)$ を越えるとき 5% の有意水準で x は何れのグループにも属さないといえる。

図5-19は、ナマズ網膜に神経伝達物質と反応する酵素セルトニンとドーパミンを注入し、各々反応した細胞体像を(a)と(b)に示す。セルトニンと反応したものは、面積が小さく丸いものの、ドーパミンと反応した細胞は面積が大きく形態のばらつきが大きいという特徴づけがなされる。これに対し、500個のナマズ網膜の神経節細胞の細胞体に対し(a)に含まれる62個のグ

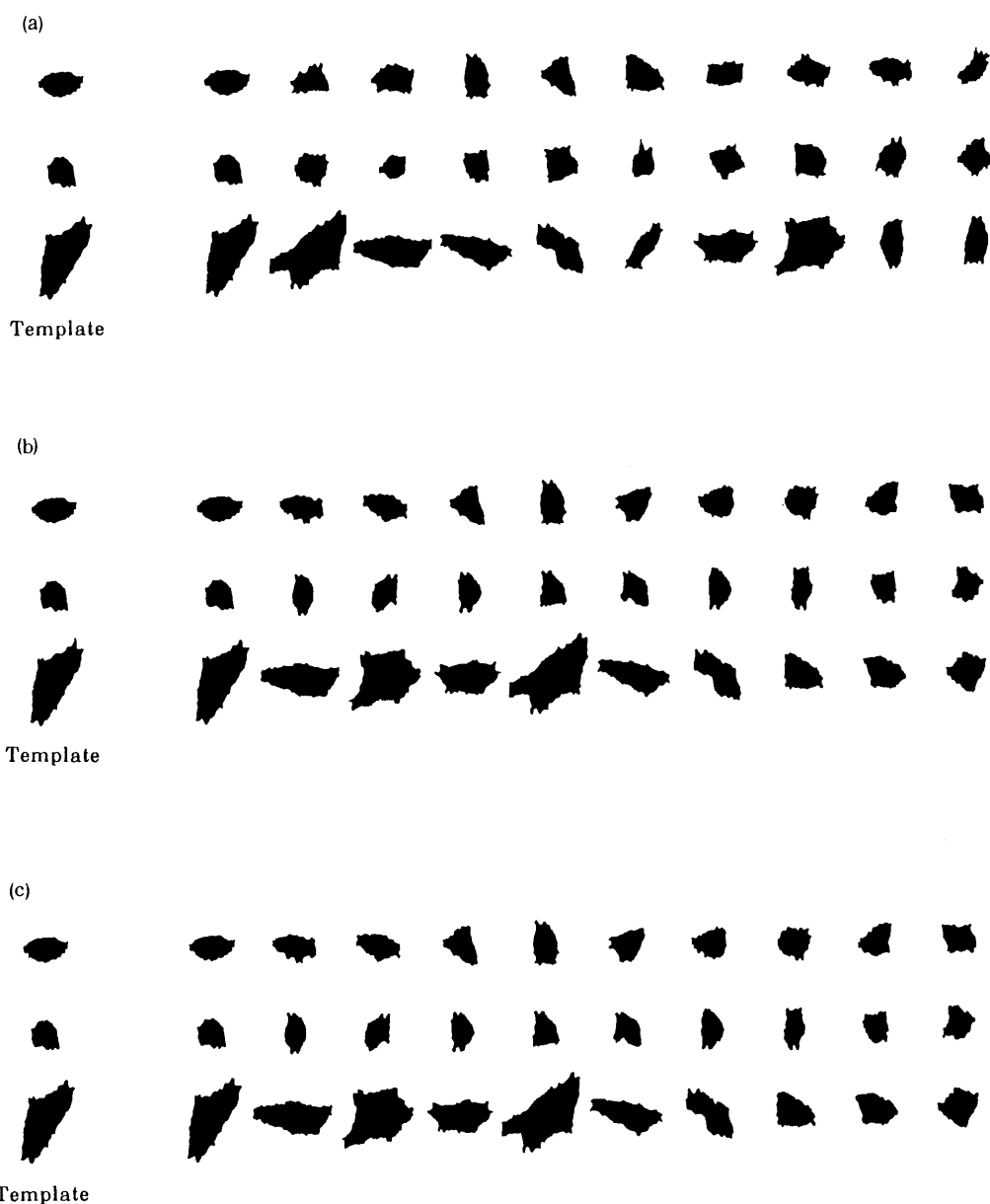


図5-18 主成分分析の結果の形態分類への応用

(a) 共通因子1を含む特徴量のみ (b) 因子1と因子2を含む特徴量 (c) 因子1～因子3を含む全特徴量によるテンプレートマッチング

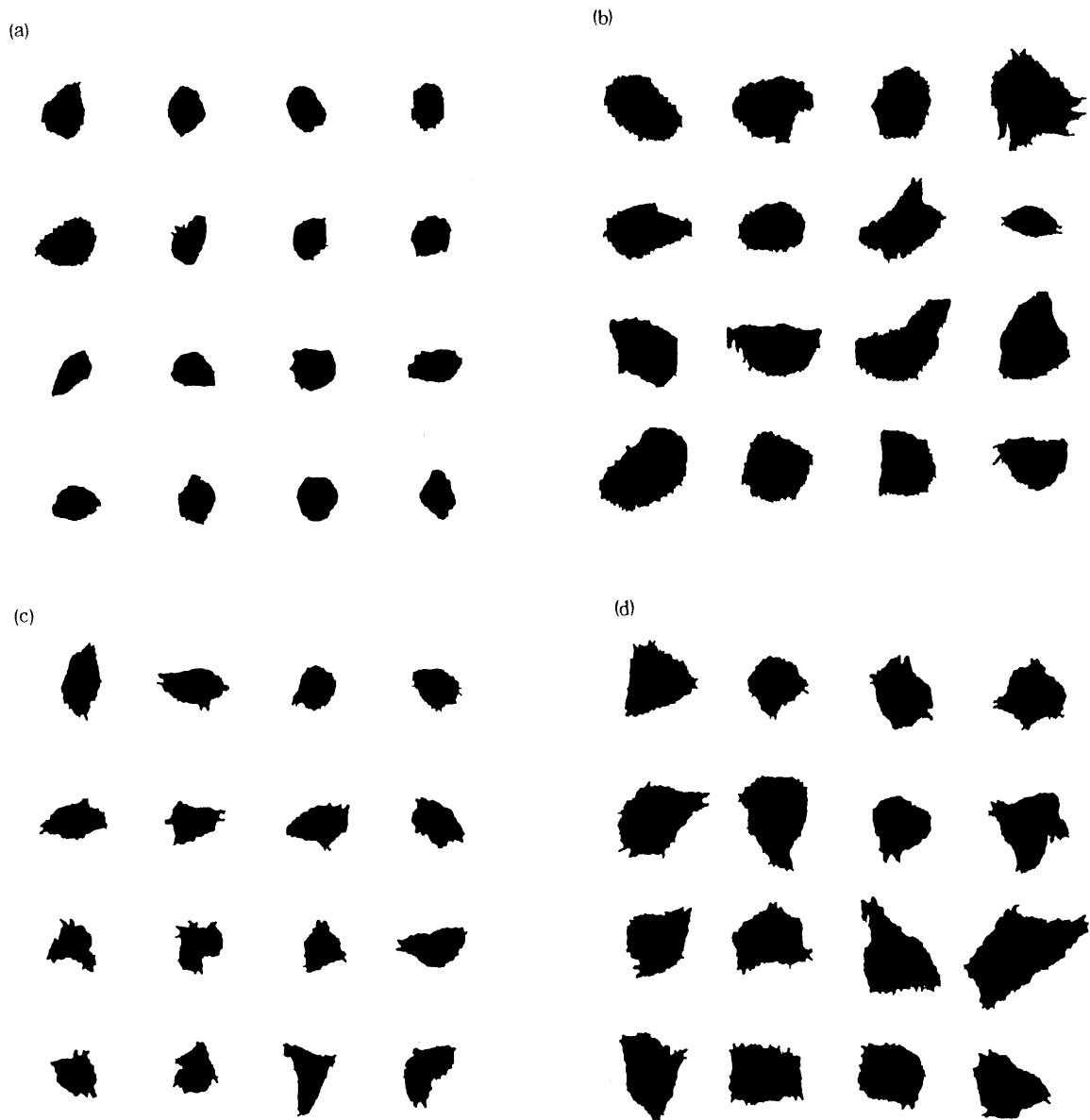


図5-19 ナマズ網膜の神経節細胞像500個から酵素反応細胞と形態的に類似した細胞像を判別分析により抽出した結果. 特徴量は面積と長径/短径

(a) セルトニン (b) ドーパミンと反応した細胞の細胞体像および神経節細胞において (c) (a) と類似 (d) (b) と類似した細胞と判定された細胞体像

ループとのマハラノビスの平方距離を用い検索を行い抽出された細胞像の一部を(c)に示す. 同様に, (b)に含まれる55個のグループとマハラノビスの平方距離を用い抽出した細胞の一部が(d)である. いずれも $\chi^2(p; 0.05)$, すなわち5%の有意水準で検索を行ったものである. 特徴量には, 面積と長径/短径を用いている. 特徴量の選択の仕方では判別結果が変化すると考えられるが(a)と(c), (b)と(d)はかなり類似した細胞で構成されている.

5. 6 むすび

本章では、細胞画像認識システムにおける形態に関する特徴抽出の手法について述べた。まず、形態解析を行うための細胞形態の特徴量に関して検討した。特徴量は、形態を巨視的にとらえるものを抽出し、画像処理で自動的に計算できるものとした。このような特徴量は、大量の細胞画像を対象とした客観的な形態解析に適すと考えられる。具体的には細胞画像に関しては、大きさに関する面積、長径、短径、周囲長、半径の平均値、細長さを表す長径/短径、輪郭線の複雑さに関する周囲長²/面積、半径の分散と、極座標展開等により得られた系列データに関する自己相関関数、フーリエ変換によるパワースペクトル、系列に自己回帰モデルを適用した際の線形予測係数とパワースペクトル、2つの系列に関する相互相関関数である。主樹状突起に関しては、本数、突起の分岐点の位置、分岐点における突起の伸びる方向である。これらの特徴量を用いて、そのヒストグラム、スキャタダイアグラムを1000個のナマズ網膜神経節細胞について求めることにより、従来明確でなかったり、研究者の主観的判断に基づいていた統計的性質を明らかにすることができた。樹状突起に関しても、自動的に構造解析を行うことが可能となった。

次に、求めた特徴量を用いた形態分類、検索手法に関する検討を試みた。形態分類には、クラスタリング、検索手法としても用いられるテンプレートマッチングの手法を用いた。特徴量空間における形態の類似度の定義を行い、その類似度を尺度とし、特徴量空間内において類似しているものから順にグループを構成するクラスタリングに関し、グループ間の融合距離等の検討を行った。これらの分類手法をナマズ網膜神経節細胞に適用した結果、形態的に数個のグループに分類できた。人が形を分類した結果と計算機が分類を行った結果の比較においては、特徴量の選択法にも依存するが結果に相違がみられた。

最後に、多変量解析の手法を用いた形態解析に関する検討を行った。まず、特徴量の数の圧縮と互いに独立な特徴量を複数個用いる解析を目的として主成分分析を行った。次に、あるグループの細胞に対し、他の細胞がそのグループに属するか否かの判別分析をグループと比較細胞とのマハラノビス距離を χ^2 検定により行った。主成分分析をナマズの網膜神経節細胞に適用し、寄与率の大きい主成分のみを分類に用いることにより、他の主成分を加えた分類結果に劣らない結果が得られた。また、判別分析は、神経伝達物質を有する細胞に対し、神経節細胞を判別し、これらと類似した細胞を抽出することができた。

第6章 細胞画像認識システムによる網膜細胞形態の成長過程および異種生物間の比較

6. 1 はしがき

神経形態学の分野では各種の研究が行われているが、その中で生物の成長に伴う細胞形態の変化の解析、あるいは異種生物間の同一部位細胞の形態比較は関心を持たれたテーマの一つである。

生物の成長過程に伴う形態解析に関しては、例えば、ネコを対象とし、神経細胞の樹状突起の数、長さ、終端点や分岐点の個数、太さ、あるいは、細胞体の大きさの変化を解析したもの⁽¹²⁸⁾や、神経細胞の軸索の直径、種類の変化の解析⁽¹²⁹⁾、細胞のシナプスの大きさ、細胞体の大きさ、樹状突起の端点の数や突起部分の重なり面積の変化⁽¹³⁰⁾や、細胞体形態および特定の部位に存在する細胞の個数等の変化の解析を行うもの⁽¹³¹⁾が報告されている。また、カエルとオタマジャクシを対象として網膜細胞の軸索の有無、長さの変化を解析したもの⁽¹³²⁾やラットの成長に伴う神経細胞の細胞体、樹状突起の形状の変化を解析⁽¹³³⁾したものがある。さらに、カエルとオタマジャクシを対象として脳細胞において酵素抗体反応を示す細胞の存在位置、分布密度の変化を解析する⁽¹³⁴⁾研究や、あるいは特定酵素と抗体反応を示す細胞の個数や存在位置を比較する研究⁽²⁹⁾等多数報告されている。これらの解析により、各成長段階における特定神経の活動の活発さ、神経の成長に必要となるエネルギーの量、神経間のネットワークの発達速度、特定神経に神経伝達物質が存在する成長段階等が予測できる。

異種生物の形態比較は、生物の成長過程における形態解析と比較し報告されている例は少ないが、ラットとサルにより同一部位の神経細胞で特定アミノ酸を有する細胞の大きさの分布の比較⁽¹³⁵⁾、コウモリとラットおよびブタに関し脳の神経細胞を対象に細胞内染色を施し形態分類を行い、グループ分けされた各細胞の存在位置や個数の比較⁽¹³⁶⁾、ブタとウサギの神経細胞の細胞体および樹状突起に関する形状、細胞の存在位置、核の大きさの比較⁽¹³⁷⁾、カメ、ハト、ラット、ネコおよびサルに関し、神経伝達物質ドーパミンを受容する神経細胞の個数とその形態の比較、および、細胞内染色で分類した各細胞体の大きさ、個数の割合などの統計的性質の比較⁽²⁹⁾などが行われてきた。これらから、神経伝達物質の有無の種による比較、発達している脳の部分や神経細胞の種類の比較、ある刺激に対する反応が行われるまでのメカニズムの比較などの検討が可能となる。

本章では、本研究で構築、応用を行っている細胞画像認識システムを用いて、ナマズとカエル及びオタマジャクシの網膜の神経節細胞の形態比較を行い、各生物の細胞形態の特徴付け、相違点、類似点、カエルの成長に伴う細胞形態の変化、ナマズとカエルおよびカエルとオタマ

ジャクシの細胞形態の比較などについて解析した結果を述べる。

6. 2 解析内容

解析対象は、ナマズ、カエル、およびオタマジャクシの網膜の神経節細胞で、その個数はナマズ 100 個、カエル 68 個、オタマジャクシのステージ 29 が 23 個、ステージ 30 が 23 個で、それぞれについてメチレンブルー法により染色した光学顕微鏡像である。

解析内容は以下の 3 点である。

(1) 形態の特徴量による神経節細胞の特徴づけ

細胞体の大きさ、輪郭線の形状、主樹状突起の本数に関する特徴量を計算し、各生物における特徴量の平均値、標準偏差、ヒストグラム、2 つの特徴量の 2 次元ヒストグラムなどを求めることにより各生物の細胞形態を特徴づける。

(2) 神経節細胞に関する形態の類似点および相違点に関する解析

異種生物であるナマズとカエル、あるいはオタマジャクシとカエルに関し、神経節細胞の形態に関する特徴量の変化、あるいは統計分布の相違、特徴量空間内でのグループ構成に関する比較、検討を行う。

(3) 神経節細胞を分類する特徴量および類似度の抽出

異種生物であるナマズとカエルの神経節細胞を計算機で自動分類するために適する特徴量およびクラスタリング手法における融合距離の検討

6. 3 解析結果

図 6-1 は、解析対象とした細胞の 2 値画像の例である。(a) ナマズ、(b) カエル、(c) オタマジャクシの神経節細胞画像である。(a) に関しては形態のばらつきが大きい。(c) は、形態が全般に類似している。

表 6-1 は、細胞体の面積、長径、短径、周囲長、細長さを表す長径/短径、輪郭線の複雑さを表す周囲長²/面積、半径の平均、および半径の分散の 8 つの特徴量に関するナマズ、カエル、オタマジャクシの平均値と標準偏差である。面積、長径等大きさに関する特徴量は、カエルが最も大きく、ナマズとオタマジャクシは同程度である。大きさに関する標準偏差は、ナマズが大きい。長径/短径は、ナマズがカエル、オタマジャクシより大きく、細長い細胞体を持つものが多いことが分かる。

図 6-2 は、(a) 面積、(b) 長径/短径、(c) 主樹状突起の本数に関する、各生物別に求めたヒストグラムを示す。面積に関しては、ナマズとカエルでは、カエルの方が大きく、分布の範囲も広い。ナマズは、約 150 (μm^2) に集中した分布となり分布形状はカエルと大きく異なっている。カエルとオタマジャクシを比較するとカエルの網膜細胞の方が大きくかつ分布がかなりばらついている。オタマジャクシは成長に伴い神経節細胞の大きさは大きくなり、かつ大きさ

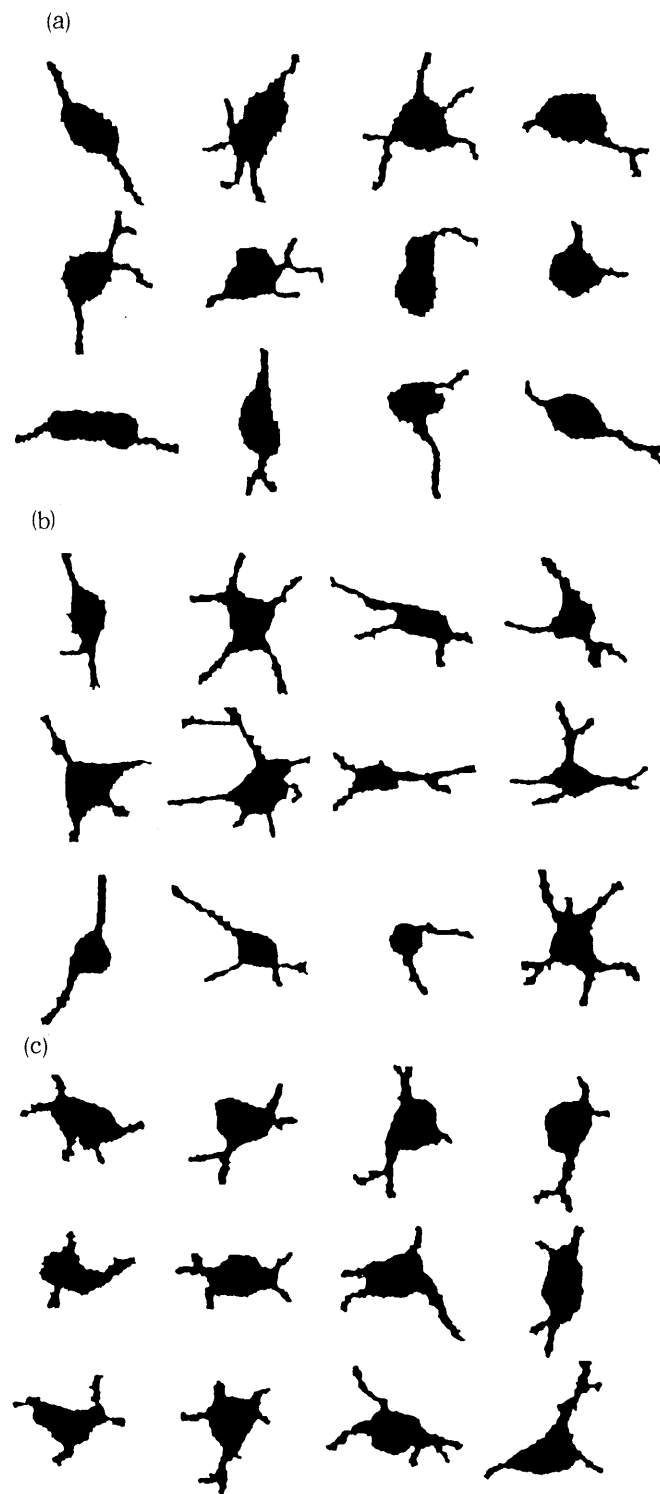


図6-1 解析対象とした網膜の神経節細胞の2値画像の例

(a) ナマズ, (b) カエル, (c) オタマジャクシ

表6-1 各生物の神経節細胞の細胞体形態の特徴量の平均値と標準偏差

| 生物 | 特徴量 | 面積(μm^2) | 長径(μm) | 短径(μm) | 長径/短径 | 周囲長(μm) | 周囲長 ² /面積 | 半径の平均 | 半径の分散 |
|---------|------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------|----------------------|----------------------|-------|-------|
| ナマズ | 平均値 | 185.8 | 22.1 | 10.7 | 2.17 | 80.3 | 35.5 | 7.3 | 4.7 |
| | 標準偏差 | 86 | 6.4 | 2.6 | 0.87 | 28 | 10.2 | 1.4 | 5.8 |
| カエル | 平均値 | 482.5 | 34.8 | 17.5 | 2.06 | 124.8 | 33.2 | 11.9 | 11.1 |
| | 標準偏差 | 175 | 7.7 | 3.4 | 0.65 | 32 | 8.0 | 2.1 | 12.2 |
| オタマジャクシ | 平均値 | 214.5 | 22.5 | 12.8 | 1.8 | 77.5 | 28.4 | 8.2 | 2.9 |
| | 標準偏差 | 38 | 3.2 | 1.6 | 0.42 | 8.6 | 4.2 | 0.7 | 2.4 |

に関する特徴量のばらつきの範囲も広がることが推測できる。また、オタマジャクシとナマズの神経節細胞の細胞体の面積のヒストグラムにおいて類似傾向がみられる。(b)は、細胞体の細長さを表しているが、ナマズの網膜細胞は、カエル、オタマジャクシと比し値の大きい方に分布が偏っており、細長い細胞体が多いことが分かる。カエルとオタマジャクシに関しては、分布形状が類似していることが分かる。(c)の主樹状突起の本数は、ナマズとカエルを比較すると、ナマズの方が本数の少ないものが多く存在する。また、カエルとオタマジャクシに関しては、主樹状突起が4本のものが多いことが分かる。

図6-3は、横軸に細胞体の面積、縦軸に細胞体の長径/短径の分布を示す2次元ヒストグラムである。横軸、縦軸を各40分割し各格子点に含まれる細胞の個数を数字で表している。(a)がナマズ(b)がカエルを表している。(a)によりナマズの細胞体は、面積の大きいものは、長径/短径も大きく細長いものが多いという比例傾向がみられる。ところが、(b)のカエルは、横軸方向に広がった分布を示し、面積と細長さの比例傾向は顕著に見られず、面積に関する分布の範囲が広いことに比し、長径/短径は一定の値を持つことが分かる。

表6-2は、各生物において、面積と長径/短径に関して類似度の大きいものから順にグループを構成するクラスタリング手法により分類した結果を比較したものである。最も類似度の小さい距離を100として、表に示す50, 40, 30の距離におけるグループの構成要素の数とその特徴量の平均値およびカッコ内に標準偏差値を表している。この結果よりオタマジャクシは、互いの類似度が最も大きく距離の小さいところで全体が一つのグループにまとまっている。カエルに関しては、特徴量に関する分布の範囲が広いめか、距離が大きく、かつ存在するグループの数が最も多い。

次にカエルの成長に伴う網膜細胞の形態比較を行った。比較対象は、足が認められるようになるステージ29と、足の先端に、第1指、第4指の分化が見られるようになるステージ30のオタマジャクシおよびカエルで行った。図6-4は、(a)がカエル、(b)がステージ30、(c)がステージ29のオタマジャクシの主樹状突起の本数のヒストグラムである。(b)と(c)に関しては、相違は見られないが、カエルに関しては、本数の多い細胞が相対的に増加している。

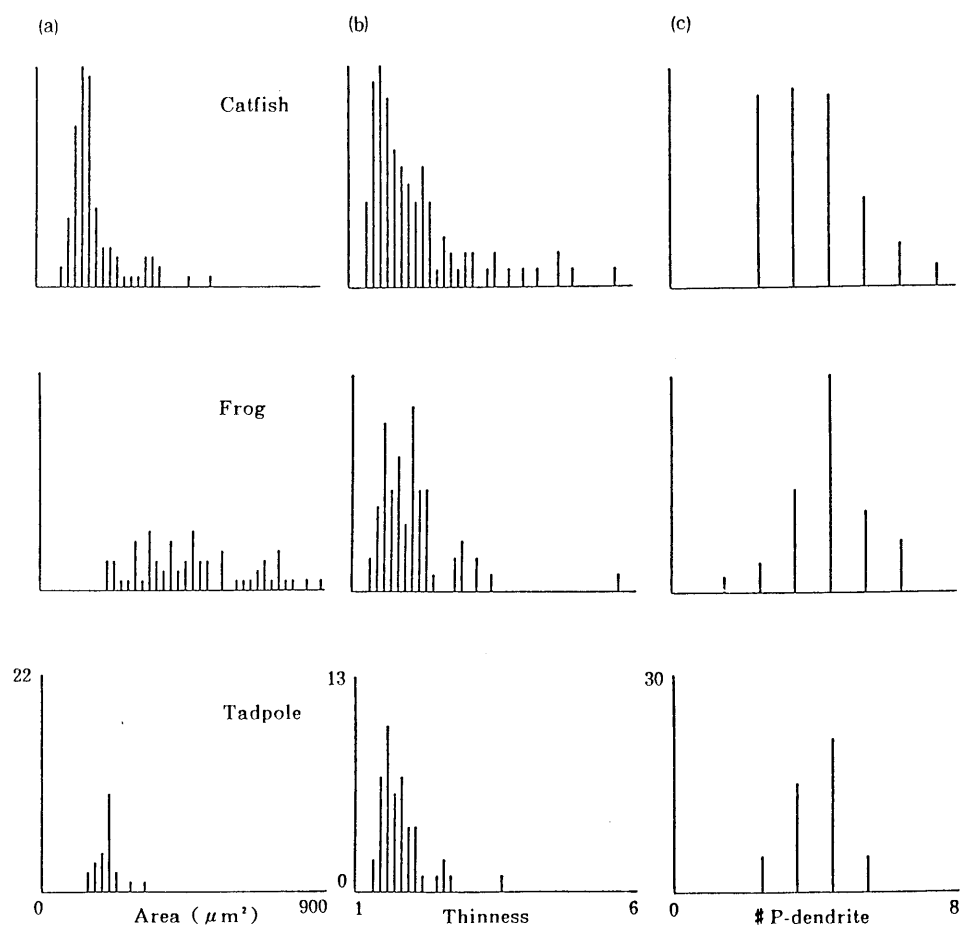


図6-2 各生物に関する神経節細胞像の (a) 細胞体の面積, (b) 細胞体の長径/短径, (c) 主樹状突起の本数に関するヒストグラム. いずれも, 上からナマズ, カエル, オタマジャクシである.

図6-5は, 横軸が細胞体の面積, 縦軸が細長さを表す長径/短径である2次元ヒストグラムである. (a) カエル, (b) ステージ30, (c) ステージ29である. 成長と共に水平方向の広がりが大きくなり, 面積に関する分布のばらつきが大きくなっている. それに比し, 長径/短径は, 成長に従ってあまり変化していない. さらに, この結果と図6-3の結果を比較すると (b) と (c) が示すオタマジャクシの2次元ヒストグラムは, 図6-3(a) が示すナマズから得られた結果と類似していることが分かる.

最後に, カエルとナマズの特徴を明確に分離する分類手法に関する検討を試みた. 表6-3は, カエルとナマズの面積に関するクラスタリングを行いグループ間の距離を平均距離, 重心距離, 最長距離, 最短距離で定義したときの各グループの構成メンバを表したものである. カエルとナマズを最もよく分離しているのは, 最長距離を用いたときで, カエルのグループにナマズが10個, ナマズのグループにカエルが14個含まれている. 逆に, 最短距離を用いるとカエルとナマズは, ほとんど分類されず同一グループに含まれている. 平均距離, 重心距離に

第6章 細胞画像認識システムによる網膜細胞形態の成長過程および異種生物間の比較

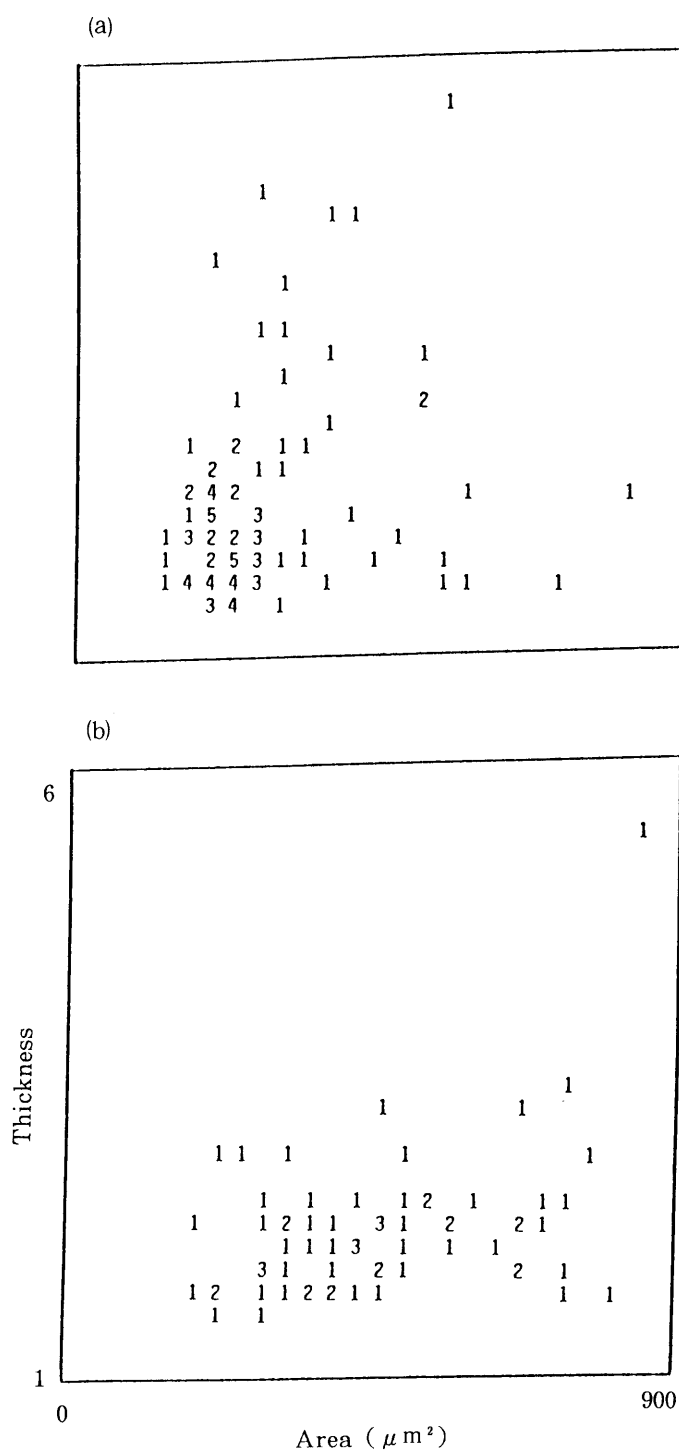


図6-3 各生物の神経節細胞の細胞体の面積と長径／短径に関する2次元ヒストグラム

(a) ナマズ, (b) カエル

関しては、類似した傾向であるが、ナマズと類似度が小さいカエルの一部の細胞によりひとつのグループが構成され、その他は、カエルとナマズ共に同一のグループに含まれている。以上の結果から、カエルとナマズの面積のヒストグラムのように、一方は分布の広がりが大きく、

表6-2 細胞体の面積と長径／短径を用いたクラスター分析の結果

| 距離 | 生 物 | グループ数 | 個数 | 面積 ($\mu\text{m})^2$ | 長径／短径 |
|----|---------|-------|----|-----------------------|-------------|
| 50 | ナマズ | 2 | 98 | 179 (73.0) | 2.17 (0.87) |
| | | | 2 | 513 (41.7) | 1.9 (0.57) |
| | カエル | 2 | 53 | 407.3 (111.2) | 1.96 (0.45) |
| | | | 15 | 747.9 (60.4) | 2.41 (1.07) |
| | オタマジャクシ | 1 | 45 | 212.2 (34.2) | 1.81 (0.43) |
| 40 | ナマズ | 2 | 98 | 179 (73.0) | 2.17 (0.87) |
| | | | 2 | 513 (41.7) | 1.9 (0.57) |
| | カエル | 4 | 28 | 495.3 (62.6) | 2.0 (0.41) |
| | | | 25 | 308.8 (56.9) | 1.9 (0.48) |
| | | | 13 | 729.9 (38.1) | 2.2 (0.6) |
| | | | 2 | 865.6 (40.8) | 3.6 (2.9) |
| | オタマジャクシ | 2 | 36 | 198.8 (21.3) | 1.7 (0.3) |
| | | | 9 | 265.8 (20.2) | 2.1 (0.7) |
| 30 | ナマズ | 3 | 80 | 149.0 (30.9) | 2.0 (0.7) |
| | | | 18 | 311.0 (58.9) | 2.8 (1.2) |
| | | | 2 | 513.0 (41.7) | 1.9 (0.6) |
| | カエル | 6 | 19 | 334.8 (35.7) | 1.9 (0.5) |
| | | | 19 | 459.4 (33.1) | 1.9 (0.4) |
| | | | 13 | 729.9 (38.1) | 2.2 (0.6) |
| | | | 9 | 571.1 (35.8) | 2.2 (0.3) |
| | | | 6 | 226.5 (17.4) | 1.8 (0.6) |
| | | | 2 | 865.6 (40.8) | 3.6 (2.9) |
| | | | 2 | 865.6 (40.8) | 3.6 (2.9) |
| | オタマジャクシ | 3 | 31 | 205.1 (14.9) | 1.7 (0.3) |
| | | | 9 | 265.8 (20.2) | 2.1 (0.7) |
| | | | 5 | 159.5 (7.2) | 1.7 (0.2) |

他方は分布が集中しその分布の中心が広がり大きい分布の端に存在するような場合には、最長距離を用いることが互いのグループ分けに適しているといえる。

6. 4 考 察

(1) カエルとナマズの神経節細胞の形態比較

カエルの神経節細胞は、ナマズに比し大きい傾向にあった。また、大きさに関する特徴量の分布の広がりも大きかった。細長さを表す長径／短径に関しては、カエルは値が小さく分布も集中しており丸いものが多いことが分かった。主樹状突起の本数は、カエルは4本のものが多い、ナマズは2～4本のものが同程度の割合で存在した。

(2) カエルとオタマジャクシの神経節細胞の形態の変化の解析

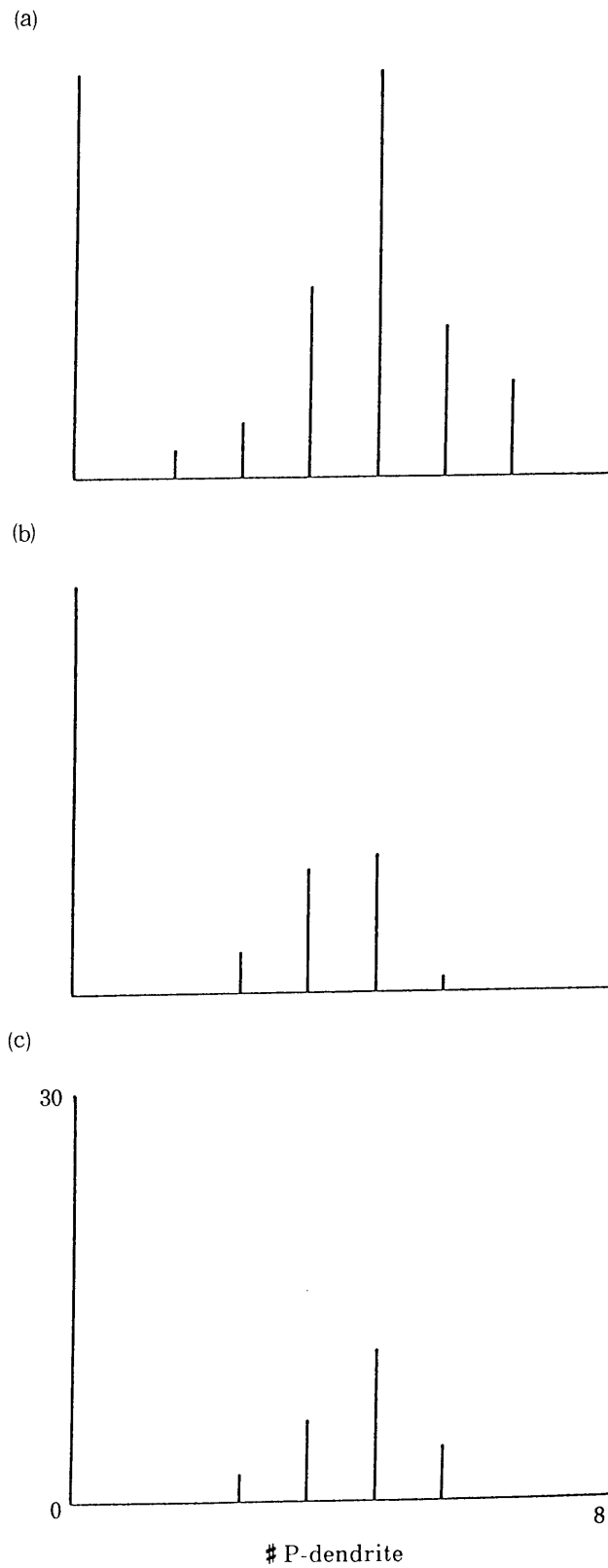


図6-4 カエルとオタマジャクシの神経節細胞の主樹状突起の本数のヒストグラム

(a) カエル, (b) ステージ 30 および (c) ステージ 29 のオタマジャクシ.

第6章 細胞画像認識システムによる網膜細胞形態の成長過程および異種生物間の比較

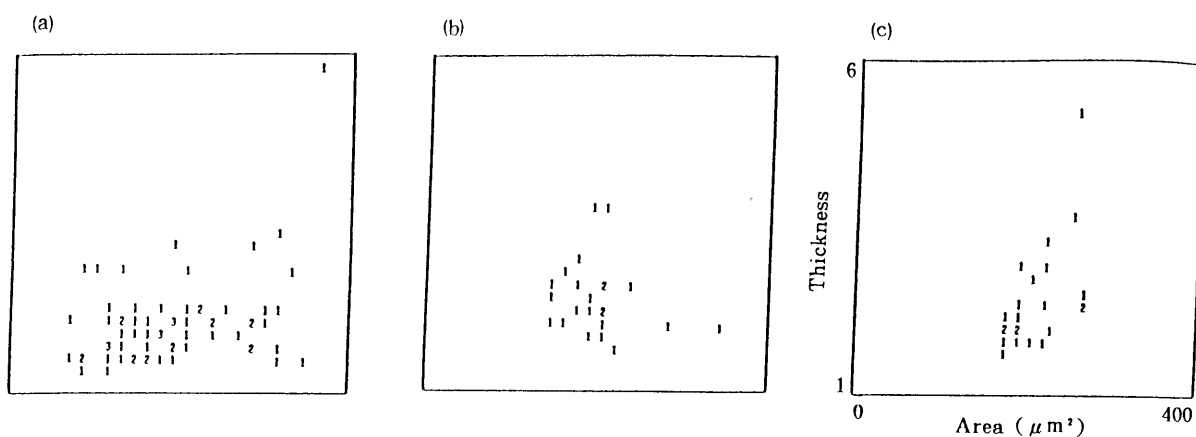


図6-5 カエルとオタマジャクシの神経節細胞の細胞体の面積と長径/短径に関する2次元ヒストグラム

(a) カエル, (b) ステージ30 および (c) ステージ29 のオタマジャクシ

表6-3 カエルとナマズの神経節細胞の特徴量空間におけるグループの融合距離の相違による分類結果の相違

| 距離 | 距離の種類 | 生物 | グループ1 | グループ2 | グループ3 |
|----|-------|-----|-------|-------|-------|
| 80 | 最短距離 | ナマズ | 100 | | |
| | | カエル | 67 | | |
| | 最長距離 | ナマズ | 10 | 90 | |
| | | カエル | 54 | 14 | |
| | 平均距離 | ナマズ | 2 | 98 | |
| | | カエル | 38 | 30 | |
| 50 | 重心距離 | ナマズ | 100 | | |
| | | カエル | 53 | 15 | |
| | 最短距離 | ナマズ | 100 | | |
| | | カエル | 53 | 6 | 6 |
| | 最長距離 | ナマズ | 10 | 90 | |
| | | カエル | 39 | 14 | |
| | 平均距離 | ナマズ | 98 | | 2 |
| | | カエル | 30 | 15 | 23 |
| | 重心距離 | ナマズ | 100 | | |
| | | カエル | 53 | 15 | |

大きさに関しては、オタマジャクシの神経節細胞の方が小さく、分布も集中していた。細長さ、主樹状突起の本数は、カエル、オタマジャクシともに類似した傾向を示した。

(3) カエル、オタマジャクシ、ナマズの神経節細胞の形態比較

細胞体形態の特徴量に関するヒストグラム、2次元ヒストグラムを比較すると、カエルとオタマジャクシより、オタマジャクシとナマズに関して多くの類似傾向がみられた。すなわち、網膜の神経節細胞の形態は生物の生活場所が水中か陸上か等の存在環境に依存して変化すること

とが推測できる。

(4) カエルとナマズの神経節細胞の分類

特徴量に面積を用いてカエルとナマズを同一の特徴量空間で分類した結果、分布が幅広く広がるカエルと、分布が集中しかつ前者の広がりの方の端の部分に集中点が存在するナマズの場合には最長距離を用いることにより分類することができた。

6. 5 むすび

網膜細胞形態を多数の細胞像を対象とし、統計的に解析することが可能な細胞画像認識システムにより、ナマズ、カエル、オタマジャクシの神経節細胞の形態比較を行った。その結果、異種生物である、ナマズ、カエルおよびオタマジャクシの同一部位細胞の形態の特徴付け、カエルの成長に伴う細胞形態の変化などについて解析することができた。

なお、本研究においては網膜細胞画像認識システムによる成長過程および異種生物間の網膜の神経節細胞の細胞体および主樹状突起の形態解析について取り扱っているため、樹状突起の広がりの方の形状を基準に提案されている α -cell, β -cell 等の分類結果については検討対象としていないことを付記する。

第7章 細胞画像認識システムによるナマズ 網膜細胞の光刺激反応

7. 1 はしがき

神経細胞の一つである網膜細胞の研究は各種行われている。特にその機能の解析に関しては、網膜に光または電気刺激を与えて、その出力を特定の細胞に電極を挿入して抽出することにより行なう例が多い。解析例としては、網膜に空間周波数や明るさ等を変化させた光刺激を照射し、その受容野の大きさ、刺激に対する感度の良さ等から、細胞に対しその機能に関する特徴付けを行い X, Y-cell と分類したり^{(2),(3),(4),(5)}、すでに分類された X, Y-cell と機能的に異なる特徴を持つ W-cell との比較⁽⁶⁾が行われている。また網膜に正弦波交流の電圧刺激を与えてその出力パルス解析することにより網膜細胞の周波数特性、減衰特性、反応の持続時間等を調べることにより、Rod と Cone の相互作用を解析するものや⁽⁷⁾、光の移動方向と空間周波数を変化させたときの応答特性を解析するもの⁽⁸⁾、あるいは網膜内の細胞に電気刺激を与えたときの反応時間、反応の伝達経路に関する解析⁽⁹⁾を行うなどに関して多数報告されている。その他、入力に白色雑音光を用いて、神経節細胞やアマクリン細胞等から反応インパルスを出し、入力と出力の相関関係を解析することにより、網膜内での信号伝達のネットワーク解析^{(11),(14)}、および情報処理のモデル推定^{(138),(139)}、等も行なわれている。

本章では、本研究において構築、応用を行っている細胞画像認識システムの統計解析等の手法を用いて、網膜の機能に関する解析を行った結果を述べる。解析内容は、網膜細胞の働きを明らかにする一つの試みとして、電流刺激と各種光刺激を網膜細胞に与えた場合のインパルス応答の頻度分布に関するものである。

ヒトや動物は、網膜において、各種光刺激を受容し、物の形状あるいは光の明るさ等を認識する。その認識のメカニズムを解明するには、まず網膜細胞が異なった光刺激を受容した時、刺激の相違に対して網膜内の各細胞の反応がどのように変化するかを調べる必要がある。そこで、多数のナマズの網膜の同一部位の細胞に数種類の光刺激と電流刺激を与えた時、インパルス反応の生起時刻、反応時間、インパルス頻度で表現する反応の強さについて解析した。このとき、同一刺激に対する反応パターンの再現性、さらに、刺激のパターンと反応開始時刻、反応持続時間、反応の強さ等の相関についても解析を行った。

7. 2 で、光刺激の種類とインパルスの頻度分布の取り込み実験および計算機への入力について述べ、7. 3 で頻度分布パターンの認識と特徴抽出について述べる。7. 4 では、認識システムの統計解析の手法を頻度分布パターンの特徴量に適用し、解析を行った結果と考察について言及する。

7. 2 光刺激反応実験

アメリカナマズより取り出した眼球を用い、その網膜に光刺激を、また水平細胞に電流刺激をそれぞれ個別に与え、その時のインパルス反応を神経節細胞より取り出した。測定に供した細胞数は1027個で、複数の異なるナマズから得た。

実験方法は、まず適当な刺激を与え、その反応を観測しながら、中枢に軸索を伸ばしている神経節細胞の一つに、インパルス応答を取り出すための電極を挿入した。次に同様の方法で、電流刺激を加えるための電極を水平細胞の一つに挿入し、光刺激を与えない暗黒の下で振幅20nA、周期360msの正弦波交流をこの電極に流し、神経節細胞よりインパルス応答を取り出した。受容細胞が光刺激を受け取ると、その刺激は水平細胞に伝達することが確かめられている。従って、水平細胞に電流刺激を与えることは、受容細胞が光を受容したことと同じ状態を人工的に作り出すことになる。

電流刺激に対する反応を取り出した後、次には電流刺激を与えずに図7-1に示す9種類の光刺激を網膜に与え、神経節細胞よりインパルス応答を取り出した。図7-1(a), (b)は、一定の明るさの棒状の光を水平方向と垂直方向に往復運動させた光刺激である。往復運動の周期は360msで、運動の範囲は、網膜全体に光が照射されるようにしてある。(c)は網膜全体に光を当て、その明るさを360msの周期で正弦波変調したものである。(d)は中央を明るくし、(e)は中央を暗くし周辺部を明るくした光刺激で、明るい部分の明るさを(c)と同じ周期で正弦波変調した。中央部分の明暗部の大きさは、神経節細胞の受容野がこれに対応するようにした。(f)~(h)は、網膜全体に光を当て、図の矢印の方向に明るさを正弦波変調したものである。

7. 3 頻度分布パターンの特徴抽出

7. 3. 1 インパルス頻度分布の入力

取り出したインパルス応答は、スパイクカウンタにより4ms間隔で計数した。360msを1周期とした16周期について同じ位置の値を平均し、それをインパルス頻度とした。変調正弦波と正弦波交流の1周期を360msとしているので、正弦波の角度 1° は1msに対応する。図7-2は横軸に正弦波の角度、縦軸にインパルスの頻度分布をとったものである。S, SY等の記号は、図7-1のS, SY等の記号に対応している。また、(i)の、currentは、水平細胞に電流刺激を与えた時のインパルス頻度分布を示している。これらの、正弦波の 0° から 1023° を 4° 間隔で区切り、各角度に対するインパルス頻度の値をもつ数値系列を計算機への入力とした。

7. 3. 2 ピークの検出

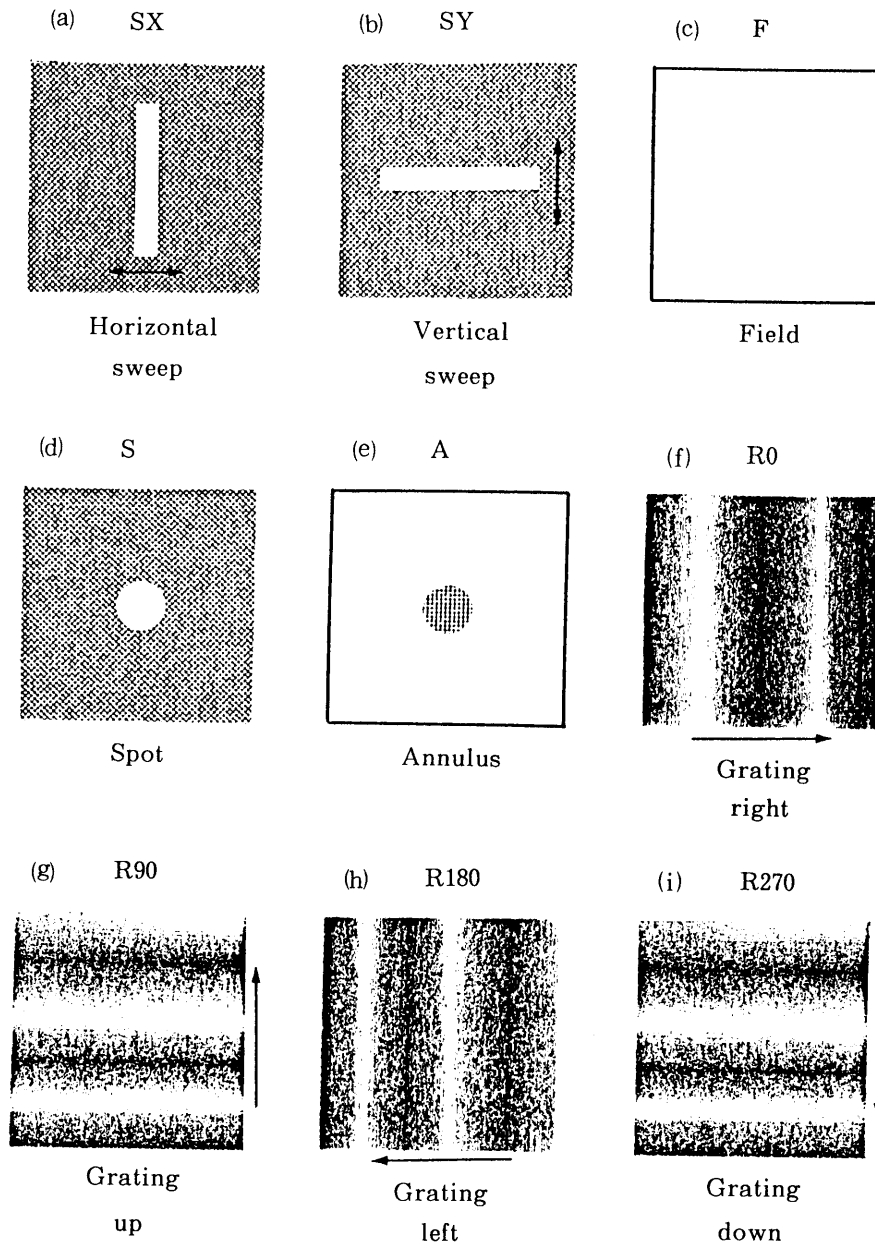


図7-1 網膜に与えた9種類の光刺激

- (a) 棒状の光の水平方向の往復運動 (b) 棒状の光の垂直方向の往復運動 (c) 網膜全体に明るさを正弦波変調した光を照射 (d) 網膜の受容野のみ明るさを正弦波変調した光照射 (e) 網膜の受容野を暗くし、周辺部に明るさを正弦波変調した光照射 (f) - (g) 矢印方向に明るさを正弦波変調

ピークとは、ゼロでない頻度が連続して続く部分全体をいう。すなわち、単位角度ごとのインパルス数を調べ、引き続く単位角度におけるインパルス数がゼロでない部分全体をピークとした。

ここで用いたデータは角度が $0^\circ \sim 1023^\circ$ で2周期半についての情報を含む。ピークの始まる角度が 360° を周期として $\pm 10^\circ$ の範囲にあるピークは同じピークとみなした。例えば、図7-2(a)では同じ形のピークが2つ半みられるが、これは、全て同じピークとみなされ、1周期に1つのピークがあることになる。

7. 3. 3 ピークの形状に関する特徴量

(1) ピークの開始角度と終了角度

ピークの位置の情報としてピークの開始角度と終了角度を求めた。各周期におけるピークの開始点と終端点は完全に一致しているわけではなくばらつきがある。そこで同一とみなされたピークの開始点のメディアン値をそのピークの開始点とし、終端点も同様に定義した。例えば、インパルス応答が、 $10^\circ, 372^\circ, 731^\circ$ で始まったとすれば、 360° が周期であるから、 $10^\circ, 12^\circ, 11^\circ$ で応答が開始したことになり、このピークの開始点は、この3個の値のメディアン値 11° と定義できる。図7-3は、インパルス頻度 $h_1 \sim h_5$ を持つ頻度分布を模式的に表示したものであるが、Sがピークの開始角度、Eがピークの終了角度である。

(2) ピークの高さと頂点の位置

ピークの形状の特徴として高さを求めた。ピークの高さは、連続する単位角度におけるインパルス頻度の最大値で定義した。そして頂点の位置は、高さが最大となる角度とした。図7-3においては高さがH、頂点の位置がPである。すなわち、ここでは、ピークと頂点との二つの語を異なった意味で用いており、前者は、頻度分布がゼロでない連続した部分全体を指し、後者は、ここでいうピークの中で頻度分布の値が最大となる位置を表す。そして、同一とみなされたピークの頂点の位置は、そのメディアン値で定義し、高さに関しては、いま定義された位置に頂点をもつピークの高さとした。角度の1周期中にピークが複数含まれる場合(図7-2(h))、高いピークから順に第1ピーク、第2ピークとよぶ。

(3) ピークの面積

ピークの形状の他の特徴量として面積を求めた。面積は、単位角度について連続するインパルス頻度の総和で定義した。図7-3を用いれば、 $\sum_{i=1}^5 h_i$ と定義する。 360° を周期とするピークは、(1)により同一ピークとみなしたが、ピークの実面積はそれらの面積の平均値をとった。また、この面積が設定値より小さいものはピークとみなさず削除した。

7. 4 解析結果と考察

本節では、7. 3で述べた特徴量に関して細胞画像認識システムの統計解析の手法を適用し、

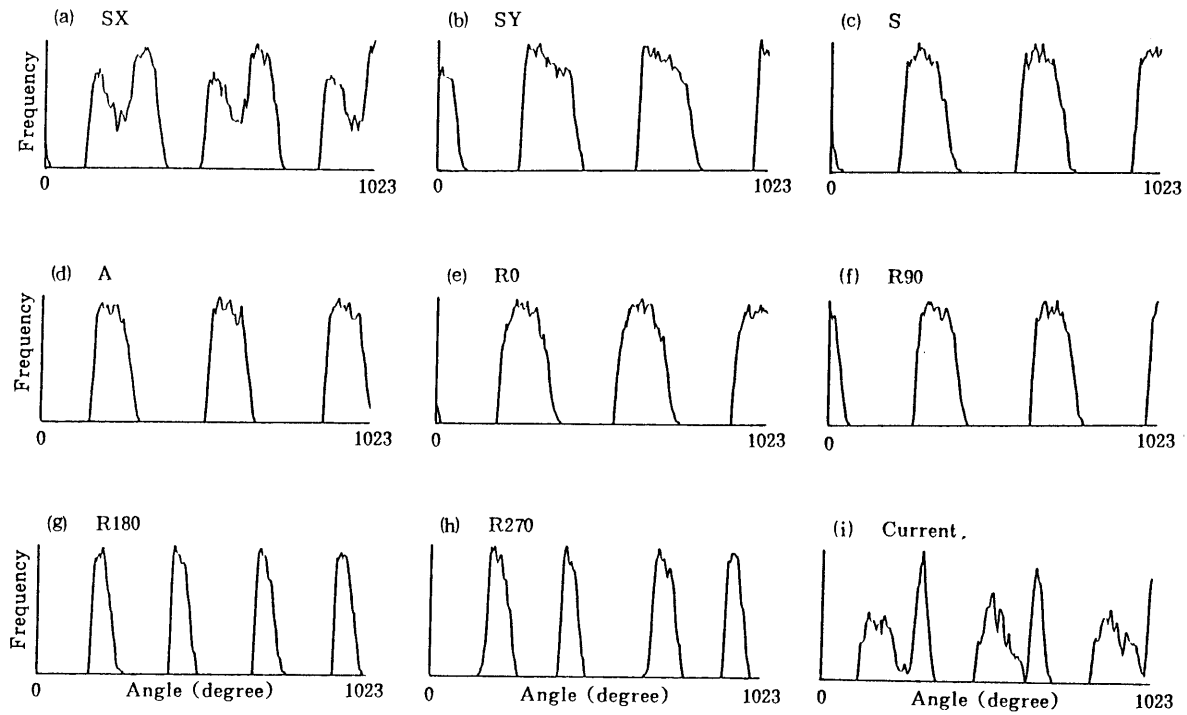


図7-2 刺激に対するインパルス頻度分布の例

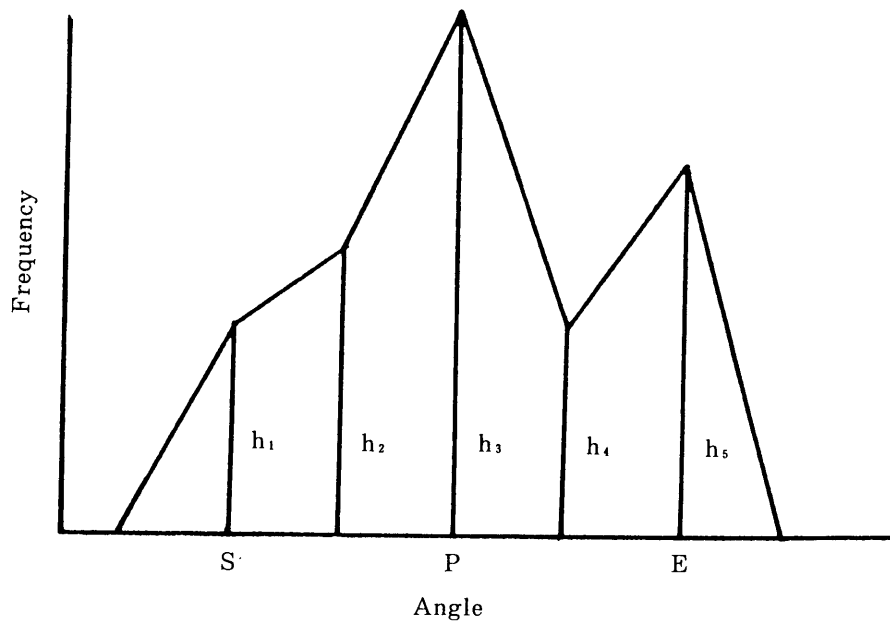


図7-3 インパルス頻度分布の形状の特徴量

S: ピークの開始角度 E: ピークの終了角度 H: ピークの高さ h_i : インパルス頻度

実際に 1027 個の細胞から得たインパルスの頻度分布を解析した結果について述べる。解析に関しては、認識システムにおける統計解析部で利用する特徴量テーブルに 7. 3 で述べた頻度分布のピークに関する特徴量を入力した。その特徴量テーブルを用いヒストグラム、スカッタダイアグラム、検索、特徴量相互の計算を行った。特徴量相互の計算に関しては、形態認識とは異なり頻度分布の解析特有のものとして、 360° を1周期とする計算も可能とした。

図 7-4 では、(a) は第 1 ピークの頂点の位置、反応の開始角度、および反応時間、すなわち、インパルス反応の終了角度から開始角度を差し引いたもの、(b) は第 1 ピークの面積と高さについて、各々の光刺激に対する 1027 個の細胞から得られた値の平均と標準偏差をプロットしたものである。SX, SY 等の記号は、図 7-1 に示す光刺激パターンに対応している。棒状の光を水平方向あるいは垂直方向に移動させた場合の各パラメータの平均値には大きな差異がなく、標準偏差も小さい。光の移動方向に関しては、ここにあげた五つの特徴量では明確に区別することができないと考えられる。SX, SY は、光の位置の移動で、その他は、あるパターン、あるいは、ある方向に明るさが正弦波変調されているが、前者の方が全てのパラメータに対して標準偏差が小さい。これは、光の有無というような強い刺激に対しては、各細胞は同じように反応するが、明るさの変動程度の刺激に対しては、刺激に対する感度にかかなりの個体差があり、標準偏差が大きくなったものと考えられる。また、(a) において、反応の開始角度より頂点の位置の角度が小さいところがあるが、これは、これらの値を 360° を周期とした角度として求めているためと考えられる。

図 7-5 は、インパルス応答の開始角度のヒストグラムである。(a) は、棒状の光を水平方向に動かした場合、(b) は光の明るさを左の方向へ正弦波変調した場合である。(a) は 90° から 270° の間でインパルス応答が開始し、多数の細胞が 180° 付近でインパルス応答が開始する。しかし、(b) はほぼ全ての角度で同程度の割合でインパルス応答が開始する。図 7-4 の場合と同様に、光の明るさの変化程度の刺激に対する反応には、かなり個体差があることがわかる。

図 7-6 は、光の明るさの変化の方向とインパルスの開始角度の関係を示す。(a) は明るさを上から下の方向へ正弦波変調した場合と、右から左へ正弦波変調した場合の第 1 ピークの開始角度の差のヒストグラムである。(b) は明るさを上から下へと、下から上へ変調した場合の第 1 ピークの開始角度の差のヒストグラムである。(a), (b) ともにゼロ付近に分布の中心があり、概略同じ分布を示すが、(b) の方がゼロ付近に集まる数がやや多いことがわかる。このヒストグラムから、明るさの変調方向に関しては、インパルスの開始角度では明確に特徴付けられないと思われる。

図 7-7 は、反応時間に関する解析である。四つのヒストグラムを示すが、いずれも第 1 ピークの終了角度と開始角度の差、すなわち、反応が継続している時間を表す。(a) は棒状の光を水平方向に、(b) は垂直方向に移動させた場合、(c) は明るさを水平方向に、(d) は垂直方向に正弦波変調させた場合である。これらのヒストグラムから、(a) と (b) および (c) と (d) の

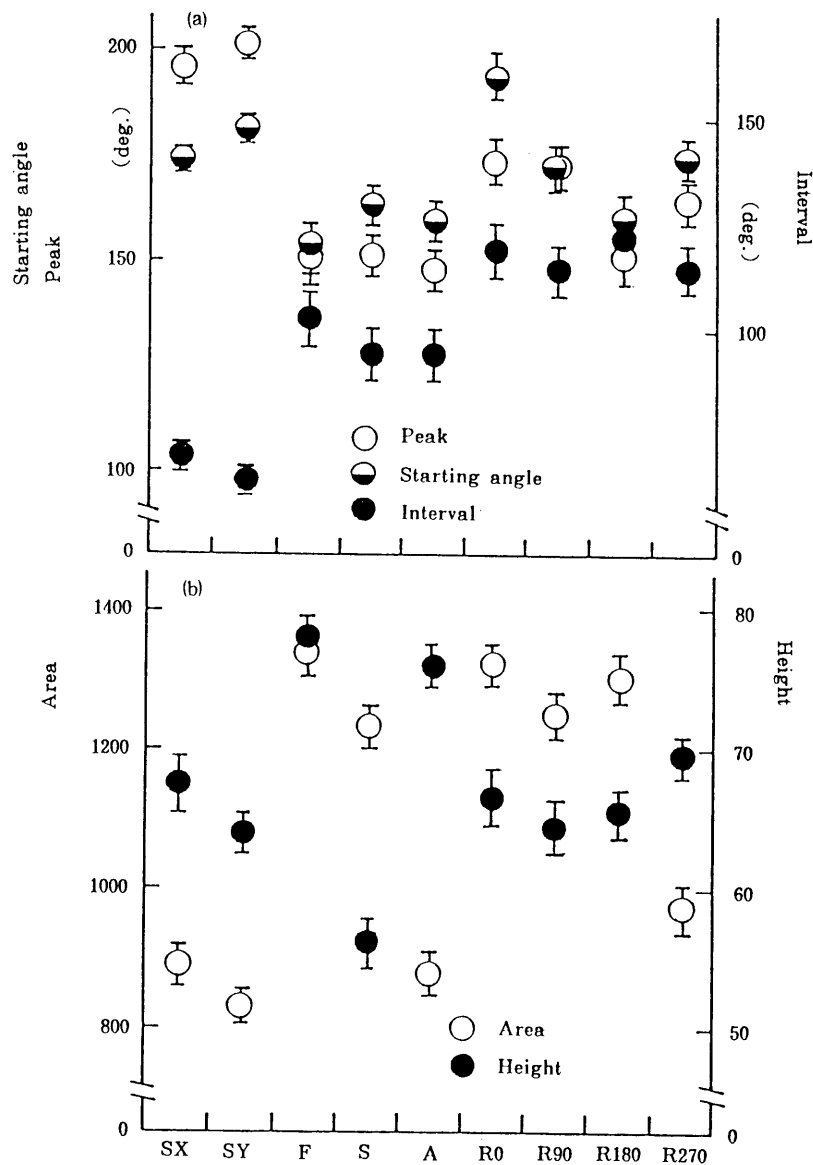


図7-4 1027個の細胞を対象とした各光刺激に対する頻度分布の特徴量の平均値と標準偏差

(a) 第一ピークの頂点の位置, 反応の開始角度, 反応時間

(b) 第一ピークの面積, 高さ

形状は類似しているが、(a)と(c), (b)と(d)の間には明確な差が現れている。(a)と(b)あるいは(c)と(d)がほぼ同じ分布を示すことは光の移動あるいは明るさの変化は、それが水平方向であれ垂直方向であれ反応時間には影響しないことがわかる。しかし、(a)と(c)等が大きく異なる分布を示すことは、ある位置における光の通過量の積分値に相当するものによって反応時間が変化することが予想できる。すなわち、(a), (b)の方が、(c), (d)より全体に値が小さく、光刺激も(a), (b)に対する方が、全体として網膜に入る光量が少ないことを示す。また、光の明るさの変化に対しては、細胞により反応時間のばらつきがかなり大きいことがわかる。

図7-8は、中央を明るく光らせた場合と、逆に中央を暗くして周りを明るくした場合の反

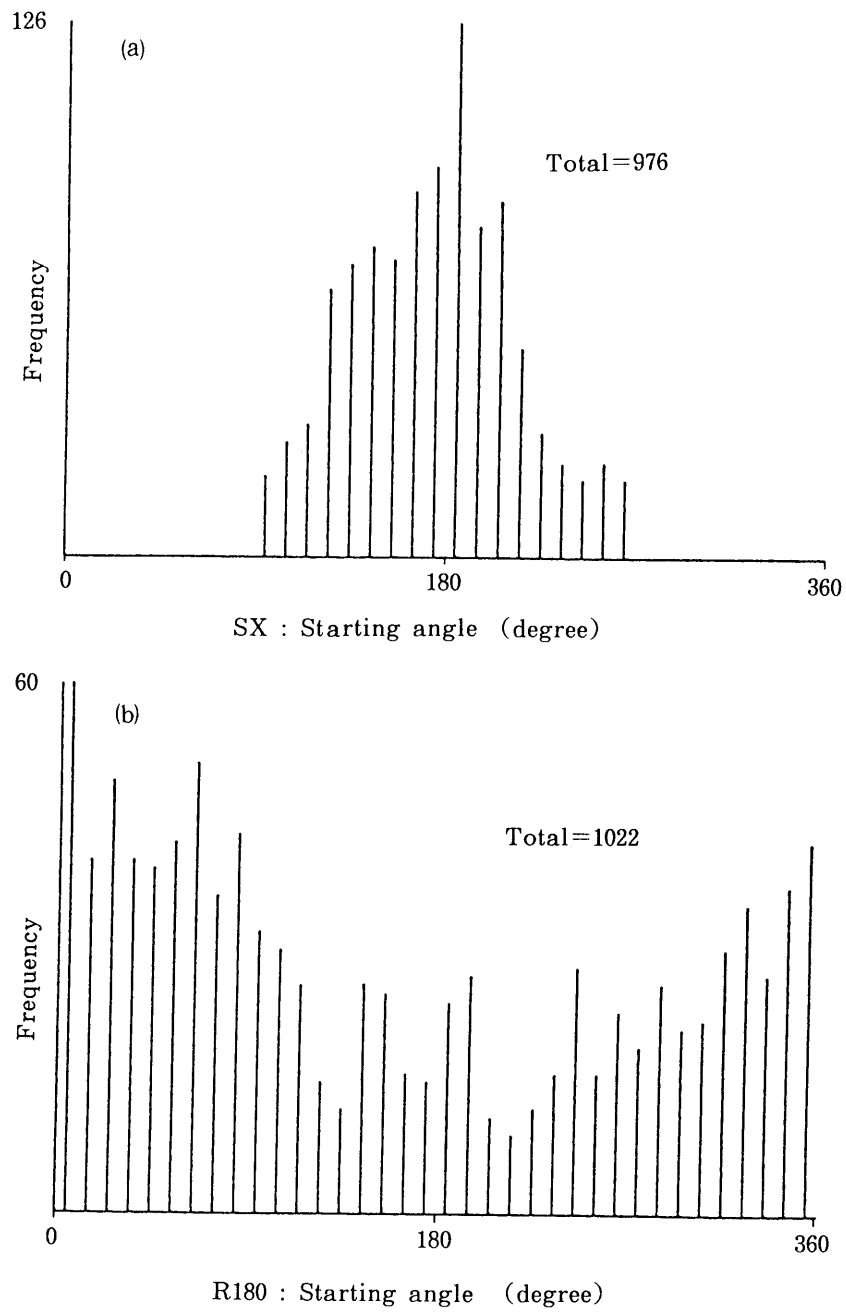


図7-5 インパルス応答開始角度のヒストグラム

(a) 棒状の光を水平方向に往復運動 (b) 光の明るさを左方向へ正弦波変調

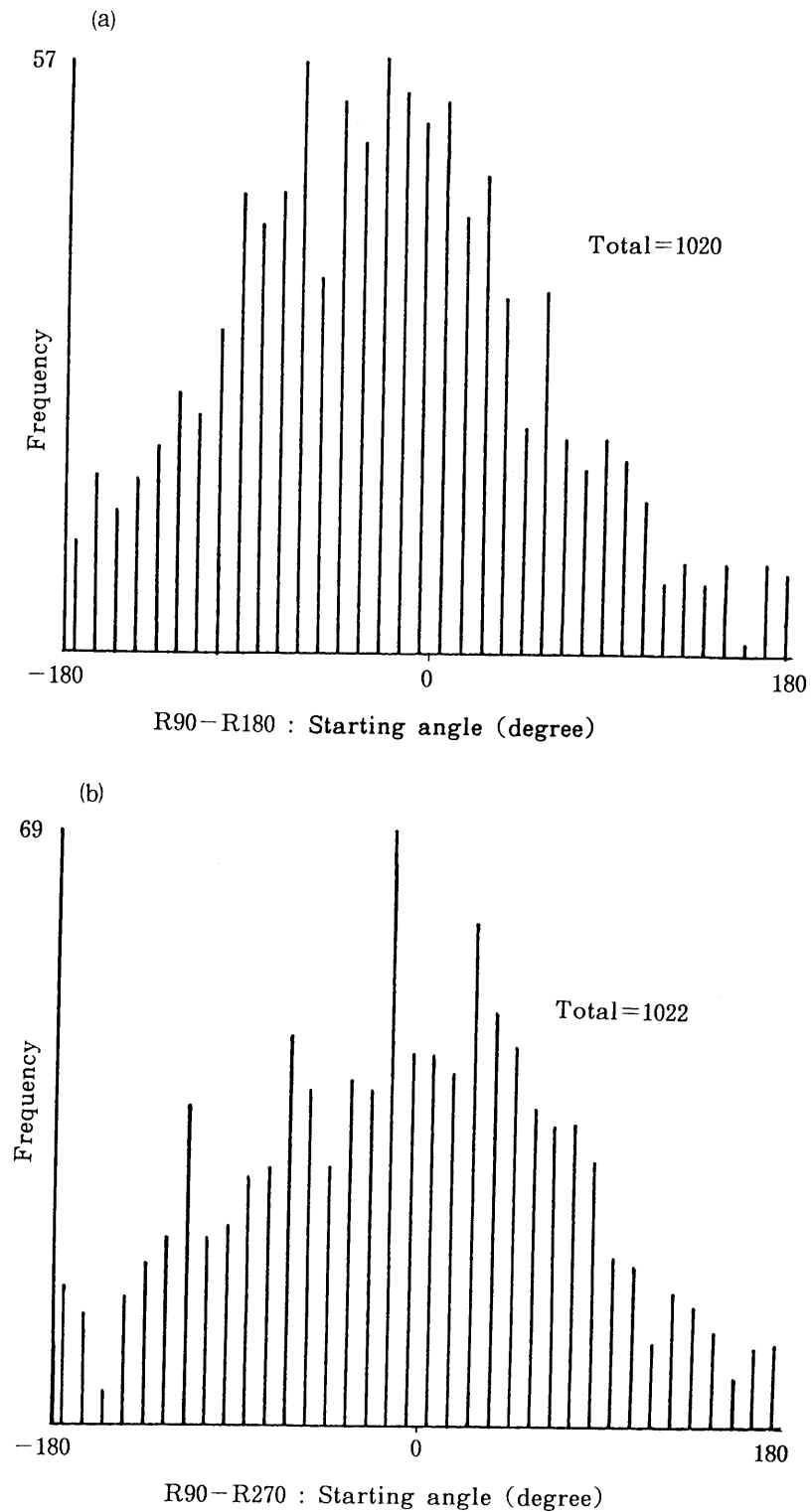


図7-6 光の明るさの変化の方向とインパルス開始角度の関係

- (a) 明るさを上から下の方向と右から左の方向へ正弦波変調した場合の第1ピークの開始角度の差のヒストグラム (b) 明るさを上から下の方向と下から上の方向へ正弦波変調した場合の第1ピークの開始角度の差のヒストグラム

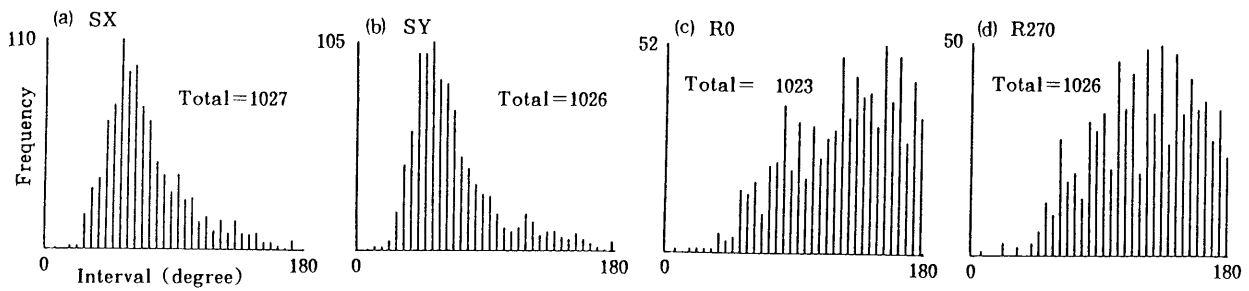


図7-7 各刺激に対する反応継続時間のヒストグラム

- (a) 棒状の光を水平方向に往復運動させた場合 (b) 棒状の光を垂直方向に往復運動させた場合
(c) 光の明るさを水平方向に正弦波変調した場合 (d) 光の明るさを垂直方向に正弦波変調した場合

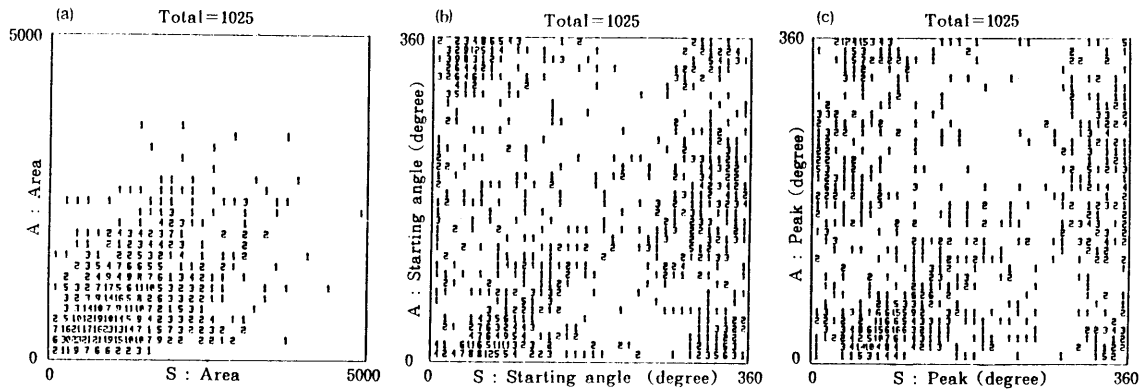


図7-8 受容野に光を照射した場合と周辺部に光を照射した場合の頻度分布パターンの特徴量の2次元ヒストグラム

- (a) ピークの面積 (b) ピークの開始角度 (c) ピークの頂点の位置

応がどのように変化するか調べたもので、全て第1ピークについて解析したものである。(a)はピークの面積について、(b)はインパルスの開始角度、(c)は最も強い反応が発生した角度について、二つの光刺激の場合の2次元ヒストグラムを表す。(a)では原点を通る対角線より下側に多く分布していることがわかりピークの面積つまり反応の強さは、中央だけ明るくした場合の方が小さいことがわかる。これは、中央だけ光らせた場合の方が光の量が少なく、そのため反応が弱くなったとも考えられる。

(b)と(c)では、4隅に多くのデータが集まっているが、これは二つの光刺激のどちらの刺激に関しても、反応開始角度、強い反応が発生する角度はほぼ同じであることがわかる。

図7-9は、光刺激に対して頻度分布のピークの面積と高さの関係を示した2次元ヒストグラムである。(a)が受容野部分を暗くし、周辺部を明るくした場合で、(b)は棒状の光を水平方向に往復運動させた場合である。ピークの面積も高さも反応の強さを反映すると考えられるが、

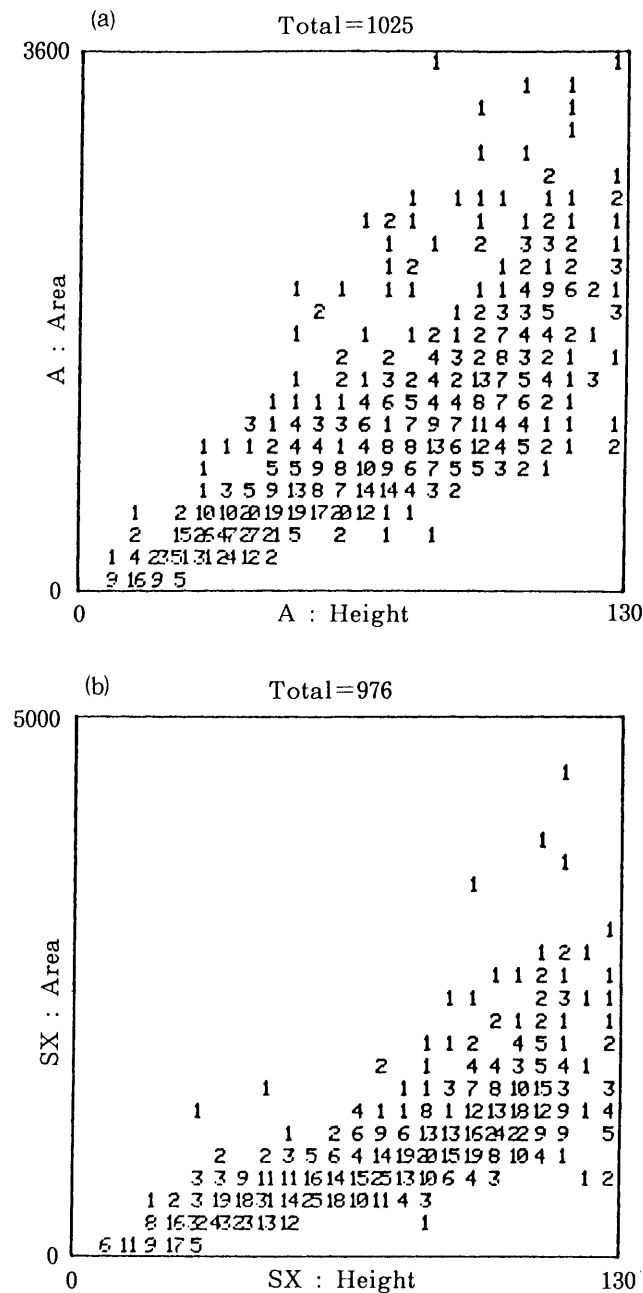


図7-9 頻度分布のピークの面積と高さの関係を示した2次元ヒストグラム

(a) 受容野を暗くし周辺部を明るくした場合 (b) 棒状の光を水平方向に往復運動させた場合

実際(a)も(b)も、特に(b)は、原点を通る右上がりの直線上に多くのデータが集中し、ピークの高さと面積は相関が高いことがわかる。また、(a)(b)以外の刺激に関しても大略ピークの面積と高さの相関は高かった。

7. 5 むすび

本章では、細胞画像認識システムを応用し、約1000個のナマズの網膜細胞の光刺激反応パ

ターンの解析結果を述べた。この結果、光の位置の移動と明るさの変化という二種類の刺激を比較すると、前者の方が刺激が強いためか細胞間のばらつきが小さく、個体差が少ないことがわかる。また、網膜への受容刺激としての光の量は反応の強さに関係しており、反応時間は光が網膜細胞に光刺激として入っている時間に比例すると考えられる。しかし、ここでの解析では、光刺激の水平方向と垂直方向の変化に対するピークの特徴量の関連は明らかにできなかった。また、各細胞の各刺激に対するインパルス頻度分布パターンの形状から、 360° を周期とした同一ピークの特徴量にはばらつきが少なく、再現性があることも確認できた。

第8章 総 括

本研究は、生物学の分野において従来試みられなかった計算機による多数の細胞画像を対象とした形態解析を目的とする細胞画像認識システムの構築とその応用に関して検討したものである。神経形態学の分野では従来、主に1つの細胞の形状を詳細に、かつ正確に測定することを目的としていた。従って、形態に関する巨視的な分類や、形態と機能との関連の解析の例はみなかった。本研究において設計を行った細胞画像認識システムは、画像処理による特徴抽出、統計解析、多変量解析の手法による形態解析が可能であるため、網膜細胞形態の客観的、定量的、システムの解析が可能である。そのため、従来行われなかった巨視的な観点の形態分類、形態と機能の関連の解析、異種生物あるいは生物の成長過程における体系的な形態比較が行える。

また、従来形態の詳細解析における問題点であった細胞画像認識の困難さ、画像データ保存のためのデータ容量の大きさに関しても、細胞画像認識システムでは、画像処理による濃淡画像の閾値化とその前処理手法の提案により自動的に細胞像が抽出可能となり認識が容易になった。また、データ保存に関しても細胞の2値画像等のコード化法の検討の結果、非常に少ない容量でデータを保存できるようになった。

以下に本研究で行った内容、得られた結果を簡単に述べる。

- (1) システムの操作性を考慮した設計思想で神経形態学研究支援用画像認識システムの構築を行なった。
- (2) 約1500個の網膜細胞画像データのデータベース化の実現を行なった。
- (3) 網膜の光学顕微鏡画像から画像処理により細胞像データの抽出、保存の自動化を行なうためのアルゴリズムの設計と実現を行なった。
- (4) 細胞像データ保存におけるデータ圧縮を目的とした細胞の2値画像および輪郭線画像の記述方法の検討を行なった。
- (5) 画像処理による細胞体と主樹状突起の自動分離を可能とした。
- (6) 画像処理による細胞体の形態に関する特徴量の抽出を行なった。
- (7) 細胞の樹状突起の形状解析のための、細胞の2値画像の骨格線化とその特徴抽出法の検討を行なった。
- (8) 形態に関する特徴量を用いた形態分類、多変量解析を行なった。
- (9) 構築した画像認識システムにより、客観的かつ定量的なパラメータを用いてナマズ網膜の神経節細胞約1000個を対象とした形態分類の結果を得ることができた。
- (10) 網膜に2種類の酵素を注入し抗体反応を示した細胞に関して反応酵素と細胞形態の関連の

解析結果が得られた。

- (11) カエル、オタマジャクシおよびナマズの網膜の神経節細胞の形態比較を行い、異種生物の同一部位細胞の形態比較を行なった。
- (12) オタマジャクシからカエルへ至る成長過程における網膜の神経節細胞の形態の変化の解析を行なった。
- (13) 細胞画像認識システムを利用し、機能に関する解析の一例である光刺激反応インパルス頻度分布の解析を行なった。

以上の研究内容を総合した結果として設計した細胞画像認識システムは、各種の生物の網膜細胞の形態解析に応用することができる。従って、従来データ量が多く扱いが困難で主観的判断に基づく解析しか行われなかった形態解析が、より客観的、定量的、統計的に行える可能性を確かめることができた。また、本研究における応用例として検討を加えたが、網膜の機能に関する電気生理の実験結果の解析も行えるため、これらの結果と形態に関する解析結果を統合し形態と機能の関連に関する解析も可能となると考えられる。

本研究は、1章で述べたように網膜細胞を対象としたため2次元画像としての解析を行った。しかし、最近の技術の向上に伴い、速い処理速度の計算機、光ディスク等の大容量の記憶装置の出現により、3次元画像生成、3次元画像解析が比較的容易に行えるようになってきた。従って、本研究で構築を行った細胞画像認識システムも、細胞画像収集、保存、特徴量の計算手法を3次元画像用に新たに展開することにより、網膜を対象とした解析のみでなく、脳神経細胞を対象とした形態解析に応用することが可能となると考えられる。これらの研究の成果は、思考のメカニズムの解明の一助を担うことが可能になると考えられるし、人工知能、ニューロコンピュータ等の研究への応用の可能性も考えられる。本研究を今後以上のような方向へ発展させていきたい。

謝 辞

本研究のテーマをお与え下さり本研究に関して終始ご指導賜り、さらに貴重な多数の網膜細胞の光学顕微鏡標本をご提供いただき、また筆者が名古屋工業大学在学中には受託大学院生として、そして豊田工業高等専門学校赴任後は個別共同研究者として本研究を基礎生物学研究所で実施できるようにお取り計らい下さいました基礎生物学研究所・中 研一教授に謹んで感謝の意を表します。

名古屋工業大学在学中の卒業論文ならびに修士論文のテーマとして、本研究に着手する機会をお与え下さり、筆者が名古屋工業大学在学中から卒業後も本研究のご指導を賜り、本論文作成に当たりご指導とご援助を賜りました名古屋工業大学電気情報工学科・石井直宏教授、鈴木宣夫教授、池田哲夫教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究は、筆者が名古屋工業大学在学中に行っていたものを、豊田工業高等専門学校に赴任後も継続して行ったものである。赴任後も継続して研究できるようにお取り計らい下さり、常に研究内容、テーマの展開、および投稿論文作成に関しご指導を賜り、さらに本論文作成に当たり多大なご指導、ご援助を賜りました豊田工業高等専門学校・高田和之教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるに当たり、貴重な網膜細胞の顕微鏡標本のご提供をいただき、さらに数々のご助言をいただきました基礎生物学研究所・日高 聡技官に深く感謝致します。また、光刺激反応の解析に際し、貴重な実験データをご提供賜り、数々のご助言をいただきました東京医科歯科大学・細川 浩助手に深く感謝致します。さらに、基礎生物学研究所計算機室において計算機等の使用に際し、数多くのご助力、ご助言をいただきました安藤祐一郎技官（現日本DEC（株））、那須昌啓技官に深く感謝致します。

本研究を進めるに当たり、数々のご指導、ご助言賜りました豊田工業高等専門学校・渡辺與作教授に深く感謝致します。また、非才な筆者に対し温かい研究環境を与えてくださり、種々ご指導とご援助とをいただきました豊田工業高等専門学校・近藤芳孝教授、野沢繁之教授をはじめ電気工学科の教職員各位に深甚なる感謝の意を表わします。

参 考 文 献

- (1) R. Y. Cajal : The Structure of the Retina. S. A. Thorpe and M. Glickstein, Eds. , Thomas Books, Springfield Illinois, (1972)
- (2) J. Bullier, and T. T. Norton : " X and Y relay cells in cat lateral geniculate nucleus ; Quantitative analysis of receptive-field properties and classification", J. Neurophysiol. , vol. 42, pp. 244–273, (1979)
- (3) C. Enroth-Cugell and J. G. Robson : " Functional characteristics and diversity of cat retinal ganglion cells", Invest. Ophthalmol. Visual Sci. , vol. 25, pp. 250–267, (1984)
- (4) R. W. Rodieck and R. K. Brening : " Retinal ganglion cells ; Properties, types, genera, pathways, and trans-species comparisons", Brain Behav. Evol. , vol. 23, pp. 121–164, (1983)
- (5) Y. T. So and R. Shapley : " Spatial properties of X and Y cells in the lateral geniculate nucleus of the cat and conduction velocities of their inputs", Exp. Brain Res. , vol. 36, pp. 533–550, (1979)
- (6) J. Stone and Y. Fukuda : " Properties of cat retinal ganglion cells ; a comparison of W-cells with X-and Y-cells", J. Neurophysiol. , vol. 37, pp. 722–748, (1974)
- (7) T. E. Frumkes and T. Eysteinnsson : " Suppressive Rod-cone interaction in distal vertebrate retina ; Intracellular records from xenopus and necturus", J. Neurophysiol. , vol. 57, No. 5, pp. 1361–1382, (1987)
- (8) R. E. Soodak, R. M. Shapley and E. Kaplan : " Linear mechanism of orientation tuning in the retina and lateral geniculate nucleus of the cat", J. Neurophysiol. , vol. 58, No. 2, pp. 267–275, (1987)
- (9) D. M. Berson : " Retinal W-cell input to the upper superficial gray layer of the cat's superior colliculus ; A conduction-velocity analysis", J. Neurophysiol. , vol. 58, No. 5, pp. 1035–1051, (1987)
- (10) D. N. Mastronarde : " Two classes of single-input X-cells in cat lateral geniculate nucleus. I. Receptive-field properties and classification of cells", J. Neurophysiol. , vol. 57, No. 2, pp. 357–380, (1987)
- (11) H. M. Sakai and K. I. Naka : " Dissection of the neuron network in the catfish inner retina. I. Transmission to ganglion cells", J. Neurophysiol. , vol. 60, No. 5, pp. 1549–1567, (1988)
- (12) H. M. Sakai and K. I. Naka : " Dissection of the neuron network in the catfish inner retina. II. Interactions between ganglion cells", J. Neurophysiol. , vol. 60, No. 5, pp. 1568–1583, (1988)

- (13) K. I. Naka, P. Z. Marmarelis and R. Y. Chan : " Morphological and functional identification of catfish retinal neurons. III. Functional identification", *J. Neurophysiol.* , vol. 38, pp. 92 – 131, (1975)
- (14) M. Sakuranaga and K. I. Naka : " Signal transmission in the catfish retina. I. Transmission in the outer retina", *J. Neurophysiol.* vol. 53, pp. 373 – 389, (1985)
- (15) G. Niemeyer and P. Gouras : " Rod and cone signals in S – potentials of the isolated perfused cat eye", *Vision Res.* , vol. 13, pp. 1603 – 1612, (1973)
- (16) R. H. Steinberg : " Rod – cone interaction in S – potentials from the cat retina", *Vision Res.* vol. 9, pp. 1331 – 1344, (1969)
- (17) B. G. Cleland, W. R. Levick and H. Wassle : " Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells", *J. Physiol. Lond.* vol. 248, pp. 151 – 171, (1975)
- (18) C. Koch, T. Poggio and V. Torre : " Retinal ganglion cells ; a functional interpretation of dendritic morphology", *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* , vol. 298, pp. 227 – 264, (1982)
- (19) L. R. Stanford : " X – cells in the cat retina ; Relationships between the morphology and physiology of a class of cat retinal ganglion cells", *J. Neurophysiol.* , vol. 58, No. 5, pp. 940 – 964, (1987)
- (20) L. R. Stanford : " W – cells in the cat retina ; Correlated morphological and physiological evidence for two distinct classes", *J. Neurophysiol.* , vol. 57, No. 1, pp. 218 – 244, (1987)
- (21) M. Sur, M. Esguerra, P. E. Garraghty, M. F. Kritzer and S. M. Sherman : " Morphology of physiologically identified retinogeniculate X – and Y – axons in the cat", *J. Neurophysiol.* , vol. 58, No. 1, pp. 1 – 32, (1987)
- (22) L. R. Stanford and M. sherman : " Structure/function relationships of retinal ganglion cells in the cat", *Brain Res.* , vol. 297, pp. 381 – 386, (1984)
- (23) H. Wassle, B. B. Boycott and R. B. Illing : " Morphology and mosaic of on – and off – beta cells in the cat retina and some functional considerations", *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* , vol. 212, pp. 177 – 195, (1981)
- (24) B. B. Boycott and L. Peichl : " Morphological identification of on – and off – centre brisk transient (Y) cells in the cat retina", *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* , vol. 212, pp. 139 – 156, (1981)
- (25) R. Nelson and H. Kolb : " Synaptic patterns and responses properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina", *Vision Res.* , vol. 23, pp. 1183 – 1195, (1983)
- (26) W. K. Schwerdtfeger and M. Lorente : " Laminar distribution and morphology of gamma – aminobutyric acid (GABA) – immunoreactive neurons in the medial and dorsomedial areas

- of the cerebral cortex of the lizard *podarcis hispanica*", J. Compara. Neurol., vol. 278, No. 4, pp. 473–485, (1988)
- (27) R. Barber and K. Saito : " Light microscopic visualization of GAD and GABA–T in immunocytochemical preparations of rodent C. N. S. " in E. Roberts, T. N. Chase and D. B. Tower(Eds) , GABA in Nervous System Fuction, New York, Raven Press, pp. 113–132, (1976)
- (28) H. Gamrani, B. Onteniente, P. Seguela, M. Geffard and A. Calas : "Gamma–aminobutyric acid–immunoreactivity in the rat hippocampus. A light and electron microscopic study with anti–GABA antibodies. ", Brain Res., vol. 364, pp. 30–38, (1986)
- (29) E. K. Richfield, A. B. Young and J. B. Penney : " Comparative distribution of dopamine D–1 and D–2 receptors in the basal ganglia of turtles, pigeons, rats, cats and monkeys", J. Compara. Neurolo., vol. 262, No. 3, pp. 446–463, (1987)
- (30) B. B. Boycott and J. E. Dowling : " Organization of the primate retina ; light microscopy. ", Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B255, pp. 109–184, (1969)
- (31) K. C. Richardson : " Studies on the structure of autonomic nerves in the intestine correlating the silver–impregnated image in light microscopy with the permanganate fixed ultrastructure in electron microscopy", J. Anat., vol. 94, pp. 457–472, (1960)
- (32) E. Ramon–Moliner : " An attempt at classifying nerve cells on the basis of their dendritic patterns. ", J. Compara. Neurolo., vol. 119, pp. 211–227, (1962)
- (33) E. Ramon–Moliner : " The morphology of dendrites. " In The Structure and Function of Nervous Tissue, G. H Baurne (Ed) , New York, Academic Press, vol. 1, pp. 205–267, (1968)
- (34) M. Palkovits, P. Magyer and J. Szentagothai : " Quantitative histological analysis of the cerebeller cortex in the cat. I. Number and arrangement in space of Purkinje cells", Brain Res., vol. 32, pp. 1–13, (1971)
- (35) S. T. Bok : " A quantitative analysis of the sturcture of the cerebral cortex", Proc. Acad. Sci. Amst., vol35, pp. 1–55, (1936)
- (36) D. A. Sholl : " Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat", J. Anat. Lond., vol. 87, pp. 387–406, (1953)
- (37) D. A. Sholl : " The organization of the cerebral cortex", Methuem and company, Ltd., London, Wieley and Sons, Inc., New York.
- (38) D. F. Wann and W. H. Cowan : " An image processing system for the analysis of neuroanatomical data", Proc. Comput. Image Proc. Symp., Univ. of Missouri, Columbia, pp. 411–419, (1972)
- (39) D. F. Wann, T. A. Woolsey and W. N. Cowan : " An on–line digital computer system for

- semi-automatic analysis of Golgi impregnated neurons", IEEE Trans. Biomed. Eng. , pp. 233-247, (1973)
- (40) E. M. Glaser and H. Van der Loss : " A semi-automatic computer microscope for the analysis of neuronal morphology", IEEE Trans. Biomed. Eng. , BME-12, pp. 22-31, (1965)
- (41) R. A. Crowther, D. J. DeRosier and A. Klug : " The reconstruction of a three-dimensional structure from projection and its application to electron microscopy", Proc. Roy. Soc. Lond. , A317, pp. 319-340, (1970)
- (42) H. Elias : " Three-dimensional structure identified from single sections", Science, vol. 174, pp. 993-1000, (1971)
- (43) D. R. Reddy, W. J. Davis, R. B. Chlander and D. J. Bihary : " Computer analysis of neuronal structure", In Intracellular Staining in Neurobiology. , S. B. Kater and C. Nicholson (Eds.) , Springer-Verlag, New York, p. 277, (1973)
- (44) C. A. Fox and J. D. Barnard : " A quantitative study of the Purkinje cell dendritic branches and their relationship to afferent fibers", J. Anat. Lond. , vol. 91, pp. 299-308, (1957)
- (45) M. J. Shantz : " Description and classification of neuronal structure in the frog retina", Thesis, Calif. Insti. Tech. , Pasadena, Calif, (1976)
- (46) P. F. Hitchcock and S. S. Easter : " Retinal ganglion cells in goldfish ; A quantitative classification into four morphological types, and a quantitative study of the development of one of them", J. Neurosci. , vol. 6, No. 4, pp. 1037-1050, (1986)
- (47) A. A. Dunn-Meynell and S. C. Sharma : " The visual system of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) . I. Retinal ganglion cell morphology", J. Compara. Neurolo. , vol. 247, pp. 32-55, (1986)
- (48) C. W. Oyster, E. S. Takahashi and D. C. Hurst : " Analysis of neuronal soma size distributions", J. Neurosci. Meth. , vol. 6, pp. 311-326, (1982)
- (49) B. D. Frank and J. G. Hollyfield : " Retinal ganglion cell morphology in the frog, *Rana pipiens*", J. Compara. Neurolo. , vol. 266, pp. 413-434, (1987)
- (50) E. H. Peterson and P. S. Ulinski : " Quantitative studies of retinal ganglion cells in a turtle, *Pseudemys scripta elegans* ; II. Size spectrum of ganglion cells and its regional variation", J. Compara. Neurolo. , vol. 208, pp. 157-168, (1982)
- (51) F. R. Amthor, C. W. Oyster and E. S. Takahashi : " Quantitative morphology of rabbit retinal ganglion cells", Proc. R. Soc. Lond. B217, pp. 341-355, (1983)
- (52) C. W. Oyster, E. S. Takahashi and D. C. Hurst : " Density, soma size and regional distribution of rabbit retinal ganglion cells, J. Neurosci. , vol. 1, No. 12, pp. 1331-1346, (1981)
- (53) 鶴岡信治, 木村文隆, 吉村ミツ, 横井茂樹, 三宅康二 : " デジタル図形の一細線化法と手書き文

- 字認識システムへの応用”, 信学論 (D), vol. J66-D, No. 5, pp. 525-532, (1983)
- (54) 横矢直和, 田村秀行: “病理標本画像データベース・システム PIMAS の開発”, 情処学論, vol. 25, No. 6, pp. 1055-1063, (1984)
- (55) 長谷川純一, 福村晃夫, 鳥脇順一郎: “胸部 X 線写真データベースのためのスケッチの応用”, 信学論 (D), vol. J65-D, No. 9, pp. 1121-1128 (1982)
- (56) 大和一晴, 畑 豊, 矢頭尚之, 橋本哲: “谷細線化による指紋照合システム”, 信学論 (D), vol. J71-D, No. 2, pp. 327-335, (1988)
- (57) 小沢一雅: “考古学研究支援型データベースシステムの構成”, 情処学論, vol. 26, No. 5, pp. 936-945 (1985)
- (58) 磯本征雄 他: “学術研究用たんぱく質データベース PROTEIN-DB”, 情処学論, vol. 21, No. 1, pp. 15-22, (1980)
- (59) E. F. codd: “ Relational Database : A practical foundation for productivity”, Communi. ACM, vol. 5, No. 2, pp. 109-117, (1982)
- (60) A. V. Aho., C. Beeri and J. D. Ullman., : “ The theory of joins in relational database”, ACM Trans. on Database Sys. , vol. 4, No. 3, pp. 294-314, (1979)
- (61) C. M. Skinner : “A heuristic approach to inductive inference in fact retrieval system”, Communi. ACM, vol. 17, No. 12, pp. 707-712, (1974)
- (62) M. Stefik., J. Aikins., K. Balzer., J. Benoit., L. Birnbaum., F. Haynes-Roth and E. Sacerdeti. : “The organization of expert systems, a tutorial”, Artific. Intelli. , vol. 18, pp. 135-173, (1982)
- (63) M. M. Astrahan., et. al. : “System R : A relational approach to database management”, ACM Trans. Database Sys. , vol. 1, No. 2, pp. 97-137, (1976)
- (64) G. D. Held., M. R. Stonebrakei and E. Wong : “INGRES : A relational database system”, Proc. of Natio. Comput. Conf. , Anaheim, California, (1975)
- (65) S. Jones., P. Mason and R. Stamper : “ LEGOL 2. 0 : A relational specification language for complex rules. ”, Inf. Sys. , vol. 4, No. 4, pp. 293-306, (1979)
- (66) L. S. Davis and N. Roussopoulos : “Approximate pattern matching in a pattern database system. ”, Inf. Sys. , vol. 5, No. 2, pp. 107-121, (1980)
- (67) K. I. Naka and N. R. G. Carraway : “ Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons I. Classical morphology. ” J. Neurophysiol. , vol. 38, pp. 53-71, (1975)
- (68) 佐野豊, 松浦忠夫, 山田久夫, 上田秀一: “セロトニンニューロンとその網状軸索”, 細胞, vol. 18, No. 3, pp. 85-89, (1986)
- (69) 横山清子, 細川浩, 中研一, 石井直宏, 高田和之: “ナマズの網膜細胞の光刺激反応”, 信学論 (D), vol. J69-D, No. 2, pp. 241-247, (1986)

- (70) J. W. Truman and S. E. Reiss : "Hormonal regulation of the shape of identified motoneurons in the moth *manduca sexta*", J. Neurosci. , vol. 8, No. 3, pp. 765–775, (1988)
- (71) 横山清子, 笹川勝久, 石井直宏, 高田和之 : "網膜細胞画像認識システム", 信学論 (D), vol. J71–D, No. 11, pp. 2396–2403 (1988)
- (72) 横山清子, 中研一, 石井直宏, 高田和之 : "網膜細胞の形態解析のためのデータ圧縮", 信学論 (D), vol. J70–D, No. 7, pp. 1354–1361, (1987)
- (73) K. Yokoyama, N. Ishii and K. I. Naka : " Software system for neuron classification based on simple parameters", IEEE Trans. Biomed. Eng. , vol. BME–33, No. 3, (1986)
- (74) 横山清子, 石井直宏, 鈴木宣夫, 中研一 : "計算機による神経細胞の形態の解析", 信学論 (D), vol. J68–D, No. 1, pp. 41–48, (1985)
- (75) 横山清子, 園田智香, 石井直宏, 高田和之 : "網膜細胞の樹状突起認識のための細線化手法の検討", 信学論 (D), vol. J71–D, No. 10, pp. 2018–2024, (1988)
- (76) 横山清子, 園田智香, 石井直宏, 高田和之 : "網膜細胞の樹状突起形状認識法の検討とその応用", 信学論 (D), vol. J71–D, No. 11, pp. 2025–2031, (1988)
- (77) 横山清子, 石井直宏, 鈴木宣夫, 中研一 : "神経細胞の2値画像の分類", 信学論 (D), vol. J66–D, No. 5, pp. 601–608 (1983)
- (78) K. D. Burau, S. M. Wood and P. A. Buffler : " Microcomputer–assisted data management in a case–comparison study", Comput. & Biomed. Res. , vol. 18, No. 4, pp. 369–376, (1985)
- (79) 伊藤元昭, 石井直宏, 桜永昌徳 : "非線形系設計システムとシミュレーション", 信学論 (D), vol. J70–D, No. 1, pp. 185–194, (1987)
- (80) R. W. Rodieck and R. K. Berening : " On classifying retinal ganglion cells by neumerical methods", Brain Behav. Erol. , vol. 21, pp. 42–46, (1982) .
- (81) 手塚慶一, 北橋忠宏, 小川秀夫 : "ディジタル画像処理工学", 日刊工業新聞社, (1985)
- (82) K. R. Castleman : Digital Image Processing, Prentice–Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, (1979)
- (83) T. S. Huang : Two–dimensional Digital Signal Processing II, Transforms and Median Filters, Spring Verlag, Berlin Heidelberg, New York, (1981)
- (84) P. M. Narendra : " A separable median filter for image noise smoothing", IEEE Trans. Pat. Anal. Mach. Intell. , vol. PAMI–3, No. 1, pp. 20–29, (1981)
- (85) A. Rosenfeld and A. C. Kak : Computer Science and Applied Mathematics, Digital Picture Processing, Academic Press, New York, (1967)
- (86) J. I. Toriwaki, N. Kato and T. Fukumura : " Parallel local operations for a new distance transformation of a line pattern and their applications", IEEE Trans. Sys. Man & Cyb. , vol. SMC–9, No. 10, (1979)

- (87) R. L. Kashap and R. Chellappa : " Stochastic models for closed boundary analysis : Representation and reconstruction", IEEE Trans. Inf. Theory, vol. IF-27, No. 5, pp. 627-637, (1981)
- (88) C. M. Williams : " An efficient algorithm for the piecewise linear approximation of planar curves", Comp. Graph. and Image Proc. vol. 8, pp. 286-293, (1978)
- (89) T. Pavlidis : Algorithms for Graphics and Image Processing, Computer Science Press, (1982)
- (90) Y. Kurozumi and W. A. Davis : " Polygonal approximation by the minimax method", Comp. Graph. and Image Proc. , vol. 19, pp. 248-264, (1982)
- (91) 上坂吉則 : "開曲線にも適用できる新しいフーリエ記述子", 信学論 (A), vol. J67-A, No. 3, pp. 166-173, (1984)
- (92) C. T. Zahn and R. Z. Roskies : " Fourier descriptors for plane closed curves", IEEE Trans. Comput. , vol. C-21, pp. 269-281, (1972)
- (93) G. H. Granlund : " Fourier processing for hand print character recognition" , IEEE Trans. Comput. , vol. C-21, pp. 195-201, (1972)
- (94) S. T. Bok : "The branching of dendrites in the cerebral cortex", Proc. Acad. Sci. , Amsterdam, vol. 39, pp. 1209-1218, (1936)
- (95) T. Hollingworth and M. Berry : " Network analysis of dendritic fields of pyramidal cells in neocortex and Purkinje cells in the cerebellum of the rat", Phils. Trans. R. Soc. London, Ser. B, vol. 270, pp. 227-262, (1975)
- (96) A. M. Paldino : "A novel version of the computer microscope for the quantitative analysis of biological structures : Application to neuronal morphology", Comput. & Biomed. Res. vol. 12, pp. 413-431, (1979)
- (97) J. J. Capowski : "Computer-aided reconstruction of neuron trees from several serial sections", Comput. & Biomed. Res. , vol. 10, pp. 617-629, (1977)
- (98) R. D. Lindsay : " Tree analysis of neuronal processes", in Computer Analysis of Neuronal Structures, Ed. R. D. Lindsay, PP. 149-164, Plenum Press, N. Y. , (1977)
- (99) A. Paldino and E. Harth : "A computerized study of golgi-impregnated axons in rat visual cortex", Computer Analysis of Neuronal Structures, Ed. R. D. Lindsay, Plenum Press, pp. 189-207, (1977)
- (100) 前田 純, 塚原伸晃 : "神経細胞の画像処理による計測", 信学技報, 医用電子と生体工学, vol. MBE79-61, pp. 47-56, (1980)
- (101) 中村鎮雄, 板垣秀信 : "胃 X 線二重造影像に対する胃部領域抽出の一方法", 信学論 (D), vol. J64-D, No. 11, pp. 1045-1052, (1981)
- (102) 恒川 尚, 下辻成佳 : "図面読取装置 TOSGRAPH", 信学論 (D), vol. J68-D, No. 4, pp. 466

-472, (1985)

- (103) 田村秀行：“図形の細線化アルゴリズムとそのデジタル幾何学的考察”，電総研報告，No. 835，pp. 25-64，(1983)
- (104) 鈴木 智，阿部圭一：“距離変換の結果を利用した二値画像の逐次型細線化”，信学論 (D)，vol. J 68-D，No. 4，pp. 473-481，(1985)
- (105) 中山 晶，木村文隆，吉田雄二，福村晃夫：“大規模画像に対する細線化アルゴリズムのパイプライン方式”，信学論 (D)，vol. J67-D，No. 7，pp. 761-767，(1984)
- (106) R. T. Chin and H. K. Wan：“A One-pass thinning algorithm and its parallel implementation”，Comput. Visi. , Graph. Imag. Proc. , vol. 40, pp. 30-40, (1987)
- (107) 鈴木 智：“細線化アルゴリズムの高速化に関する考察”，情処学論，vol. 29, No. 10, pp. 925-932, (1988)
- (108) C. J. Hilditch：“Linear skeletons from square cupboards”，in Machine Intelligence IV, (B. Meltzer & D. Michie, eds.), University Press Edinburgh, pp. 403-420, (1969)
- (109) E. S. Deutsh：“Thinning algorithms on rectangular, hexagonal and triangular arrays”，CACM, vol. 15, No. 9, pp. 827-837, (1972)
- (110) 田村秀行：“細線化手法についての諸考察”，信学技報，vol. PRL75-66, pp. 49-56, (1975)
- (111) 田口 幹，梅谷陽二：“一般平面図形の識別のための特徴量”，計測学論，vol. 16, No. 5, pp. 705-711, (1980)
- (112) L. S. Davis：“Understanding shape : Angle and sides”，IEEE Trans. on Comput. , vol. C-26, No. 3, pp. 236-242, (1977)
- (113) F. P. Kuhl and C. R. Giardina：“Elliptic Fourier features of a closed contour”，Comput. Graph. Imag. Proc. , vol. 18, pp. 236-258, (1982)
- (114) 上井良夫：“がん細胞”“計量医学”の立場から，医学のあゆみ，vol. 110, No. 13, pp. 786-792 (1979)
- (115) 渡辺貞一：“細胞診自動化”，電学誌，vol. 98, No. 11, pp. 28-32 (1978)
- (116) 舟久保 登：“電子顕微鏡写真からの計算機による細胞膜内粒子径計測”，信学論 (D)，vol. J63-D, No. 5, pp. 433-440, (1980)
- (117) 高木幹雄：“染色体”，医学のあゆみ，vol. 110, No. 13, pp. 769-774, (1979)
- (118) B. Widrow：“The ”Rubber-Mask” technique-I. Pattern measurement and analysis”，Patt. Recog. , vol. 5, pp. 175-197, (1973)
- (119) 山本真司：“血球自動分類”，電学誌，vol. 98, No. 11, pp. 32-36, (1978)
- (120) 宮地隆興：“白血球”，医学のあゆみ，vol. 110, No. 13, pp. 775-785, (1979)
- (121) G. H. Landeweerd and E. S. Gelsema：“Pattern recognition of nucleated cells from the peripheral blood”，Patt. Recog. , vol. 16, No. 2, pp. 131-140, (1983)

- (122) 奥野忠一, 久米 均, 芳賀敏郎, 吉澤 正 : 多変量解析法, 日科技連, (1971)
- (123) D. Wishart : " An algorithm for hierachical classifications", *Biomet.* , vol. 25, pp. 165–170, (1969)
- (124) 芳賀敏郎, 橋本茂司 : 回帰分析と主成分分析, 日科技連, (1980)
- (125) D. Michael and J. Houchin : " Automatic EEG analysis : a segmentation procedure based on the autocorrelation function. ", *EEG J.* , vol. 46, pp. 232–235, (1979)
- (126) 赤池弘次, 中川一郎 : ダイナミックシステムの統計的解析と制御, サイエンス社, (1972)
- (127) F. Itakura : " Minimum prediction residual principle applied to speech recognition", *IEEE Trans. Acous. Spec. Sig. Proc.* , vol. ASSP–23, No. 1, (1975)
- (128) B. Ulfhake, S. Cullheim and P. Franson : " Postnatal development of cat hind limb motoneurons I ; Chenges in length, branching sturucture and spatial distribution of dendrites of cat triceps surae motoneurons", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 278, No. 1, pp. 69–87, (1988)
- (129) P. Berbel and G. M. Innocenti : " The development of the corpus callosum in cats ; A light –and–electron microscopic study", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 276, No. 1, pp. 132–156, (1988)
- (130) A. J. Weber and R. E. Kalil : " Development of corticogeniculate synapses in the cat", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 264, No. 2, pp. 171–192, (1987)
- (131) R. O. L. Wong and A. Hughes : " Developing neuronal populations of the cat retinal ganglion cell layer", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 262, No. 4, pp. 473–495, (1987)
- (132) T. Bork, E. Schabtach and P. Grant : " Factors guiding optic fibers in developing xenopus retina", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 264, No. 2, pp. 147–158, (1987)
- (133) A. E. Mjaatvedt and M. T. T. Wong–riley : " Relationship between synaptogenesis and cytochrome oxidase activity in purkinje cells of the developing rat cerebellum", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 277, No. 2, pp. 155–182, (1988)
- (134) B. G. Szaro and H. Gainer : " Identities, antigenic determinants, and topographic distributions of neurofilament proteins in the neuronssystems of adult frog and tadpoles of *Xenopus laevis*", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 273, No. 3, pp. 344–358, (1988)
- (135) G. Battaglia and A. Rustioni : " Coeristence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 277, No. 2, pp. 302–312, (1988)
- (136) A. Aschoff and J. Ostwald : " Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs", *J. Compara. Neurolo.* , vol. 264, No. 1, pp. 56–72, (1987)
- (137) C. Evinger, W. M. Graf and R. Baker : " Extra –and Intracellular HRP Analysis of the Organization of extraocular motoneurons and internuclear neurons in the guinea pig and

- rabbit", J. Compara. Neurolo. , vol. 262, No. 3, pp. 429–445, (1987)
- (138) H. I. Krauz and K. I. Naka : " Spatiotemporal testing and modeling of catfish retinal neurons", Biophisiolo. , vol. 29, pp. 13–36, (1980)
- (139) S. Yasui, W. Davis and K. I. Naka : " Spatiotemporal receptive field measurement of retinal neurons by random pattern stimulation and cross correlation", IEEE Trans. Biomed. Eng. , vol. BME–26, pp. 263–272, (1979)

研究業績

<論文>

- ① 横山清子, 石井直宏, 鈴村宣夫, 中 研一: “神経細胞の2値画像の分類”, 電子通信学会論文誌(D), vol. J66-D, No.5, pp.601-603 (1983)
- ② 横山清子, 石井直宏, 鈴村宣夫, 中 研一: “計算機による神経細胞の形態の解析”, 電子通信学会論文誌(D), vol. J68-D, No.1, pp.41-48 (1985)
- 3 渡辺與作, 掛布英辰, 横山清子, 高田和之: “自己回帰モデルによる不整脈の特徴抽出”, 電子通信学会論文誌(D), vol. J68-D, No.5, pp.1087-1094 (1985)
- ④ 横山清子, 細川 浩, 中 研一, 石井直宏, 高田和之: “ナマズの網膜の光刺激反応”, 電子通信学会論文誌(D), vol. J69-D, No.2, pp.241-247 (1986)
- ⑤ K.Yokoyama, N.Ishii, K.Naka: “Software system for neuron classification based on simple parameters”, IEEE Trans. on Biomedical Engineering, vol. BME-33, No.3, pp.308-314, (1986)
- 6 渡辺與作, 横山清子, 高田和之, 早野順一郎, 藤浪隆夫: “多次元自己回帰モデルによるR-R間隔変動に対する血圧変動の影響の解析”, 医用電子と生体工学, vol.24, No.7, pp.511-516, (1986)
- 7 渡辺與作, 横山清子, 高田和之: “直立姿勢動揺の微分情報と姿勢保持機能の解析”, 電子情報通信学会論文誌(D), vol. J70-D, No.4, pp.811-817 (1987)
- 8 三浦美子, 渡辺與作, 横山清子, 高田和之: “歩行姿勢の評価と和服の着くずれ”, 姿勢研究, vol.7, No.1, pp.13-19 (1987)
- ⑨ 横山清子, 中 研一, 石井直宏, 高田和之: “網膜細胞画像の形態解析のためのデータ圧縮”, 電子情報通信学会論文誌(D), vol. J70-D, No.7, pp.1354-1361 (1987)
- 10 Y.Watanabe, K.Yokoyama, K.Takata and S.Takeuchi: “An evaluation of control mechanisms in a standing posture using velocity and acceleration of body sway”, Biomechanics, vol.6B, pp.1005-1010, Human kinetics publishers (1987)
- 11 渡辺與作, 横山清子, 高田和之, 竹内伸也: “荷重負荷時の直立姿勢動揺の解析”, 人間工学, vol.23, No.4, pp.233-240 (1987)
- 12 高田和之, 渡辺與作, 横山清子: “自己回帰モデルによる心拍リズムの分解と特徴抽出”, 電子情報通信学会論文誌(D), vol. J71-D, No.4, pp.726-732 (1988)
- ⑬ 横山清子, 園田智香, 石井直宏, 高田和之: “網膜細胞の樹状突起認識のための細線化手法の検討”, 電子情報通信学会論文誌(D), vol. J71-D, No.10, pp.2018-2024 (1988)

- ⑭ 横山清子, 園田智香, 石井直宏, 高田和之: “網膜細胞の樹状突起認識法の検討とその応用”, 電子情報通信学会論文誌 (D), vol. J71-D, No.10, pp.2025-2031 (1988)
- ⑮ 横山清子, 笹川勝久, 石井直宏, 高田和之: “網膜細胞画像認識システム”, 電子情報通信学会論文誌 (D), vol. J71-D, No.11, pp.2396-2403 (1988)
- 16 J.Hayano, M.Yamada, T. Fujinami, K.Yokoyama, Y.Watanabe and K.Takata: “Autonomic nervous function and spectral components of heart rate variability”, Biophysics, vol.28, pp.32-36, (1988)
- 17 渡辺與作, 横山清子, 高田和之: “各種の直立姿勢における微分情報と重心動揺周波数成分の分解による姿勢制御機能の評価”, 電子情報通信学会論文誌 (D-II), vol.J72-D II, No.4 pp.630-638, (1989)

<国際会議>

- ① K.Yokoyama, N.Ishii, N.Suzumura and K.Naka: “Automatic classification of neurons”, SPIE 27th Annual International Symposium, Sandiego, U.S.A., Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, vol. 435, pp.53-59 (1983)
- 2 Y.Watanabe, K.Yokoyama, K.Takata and S.Takeuchi: “An evaluation of control mechanism in standing posture using velocity and acceleration of body sway”, X'th International Congress of Biomechanics, Umea Sweden, (1985)
- 3 Y.Watanabe, K.Yokoyama and K.Takata: “An evaluation of control mechanism in a standing posture using an autoregressive model”, International Ergonomics Association, 10th International Congress, Sydney, Australia, (1988)

<研究紀要>

- 1 高田和之, 掛布英辰, 横山清子, 市川真澄, 渡辺與作, 竹内伸也: “加重負荷時の立位動揺”, 豊田工業高等専門学校研究紀要, 第 17 号, pp. 35-40 (1984)
- 2 高田和之, 横山清子, 掛布英辰, 渡辺與作: “心電図時系列における区分点認識”, 豊田工業高等専門学校研究紀要, 第 18 号, pp. 35-40 (1985)
- 3 横山清子, 渡辺與作, 小栗達也, 高田和之: “心電図の QRS complex 時系列の解析”, 豊田工業高等専門学校研究紀要, 第 19 号, pp. 39-44 (1986)
- ④ 横山清子, 高田和之: “網膜細胞形態解析のためのデータベースの構築”, 豊田工業高等専門学校研究紀要, 第 21 号, pp. 39-46 (1988)

(○印は本論文に関連するもの)

<口述発表> (演者のみ)

研究会 12 件

全国大会, 支部大会 20 件