

Application News

細胞観察サポートWebアプリケーション Cell Pocket™

深層学習を用いた細胞スフェロイドの形態解析と形態変遷の視覚化

山本周平、岡田光加、加地徹、江連徹

ユーザーベネフィット

- ◆ Cell Pocketを用いることで感覚的だった観察情報を簡便に定量化できます。
- ◆ 定量化した観察情報は、培養状態の客観的評価に活用できます。
- ◆ 客観的評価結果は、データと共にラボメンバーと共有可能です。

■はじめに

ヒトの多能性幹細胞は不均一な集団であり、その培養過程においても刻々と変化していく性質を持っています。したがって、細胞の状態変化の遷移も重要な品質特性になると考えられ、低分子医薬品のように製造のエンドポイントにおける製品の品質評価は細胞製剤の評価系として適していません。そのような背景から、再生医療・細胞治療の産業化を促進するため、細胞の状態を非侵襲かつ経時的に評価可能な手法が望まれています。

代表的な非侵襲評価手法では画像解析による細胞形態の評価が挙げられます。機械学習技術の爆発的な発展と普及により、従来では困難だった細胞の形態認識が実現できるようになったことで注目を集めています。

島津製作所は機械学習技術の一つ、深層学習によるセグメンテーションを用いて画像解析を簡便に実現できるWebアプリケーションCell Pocketを開発しました(図1)。Cell Pocketでは高度な画像解析を手軽に実現できるため、これまで暗黙知や感覚的だった観察情報を数値化し、重要な知見を得ることができます。本稿ではヒトiPS細胞由来内胚葉分化スフェロイドの分化成熟過程における形態の変遷を視覚化した解析例をご紹介します。

■分析条件

解析対象の細胞スフェロイド

解析対象の細胞スフェロイドの代表例を図2に示します。細胞スフェロイドは6つの分化ステージごとに形や模様・色味などの形態情報が異なります。

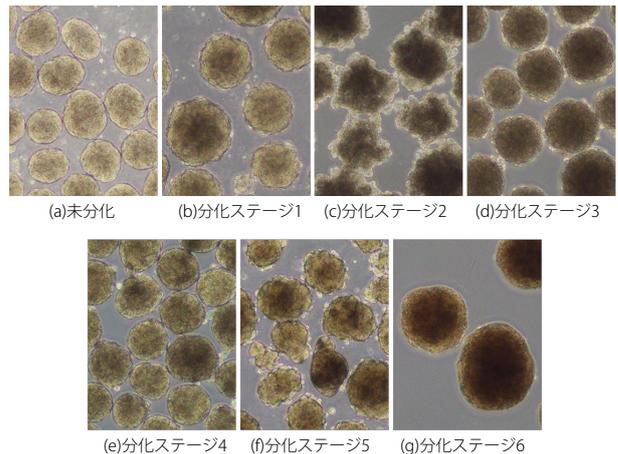


図2 細胞スフェロイドの各分化ステージにおける形態

解析に供した画像は図3のように画像中に100~300程度のスフェロイドが撮影されたものを対象としました。画像の詳細を表1に記載します。

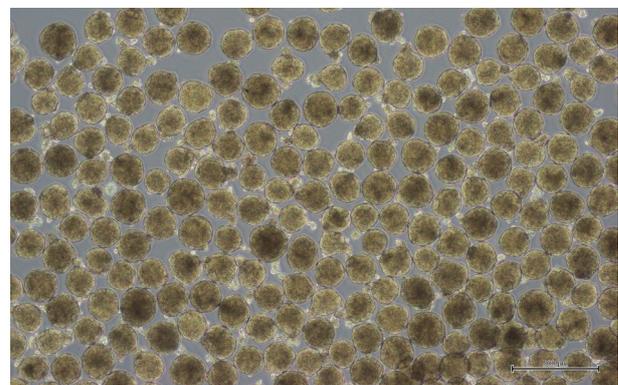
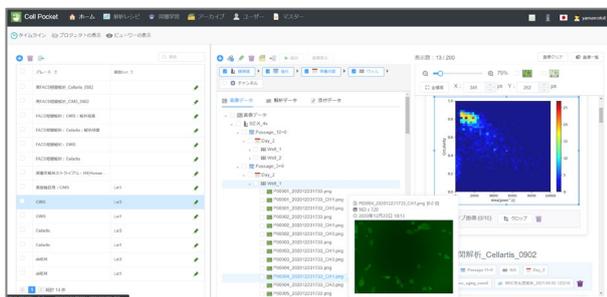


図3 解析に供したスフェロイドの顕微鏡撮影画像



- ・ラボの情報を集約して蓄積
- ・オフィスからもデータを解析、閲覧、管理

図1 WebアプリケーションCell Pocket の運用形態

表1 画像形式に関する詳細

画像サイズ	: 1920 x 1440 pixels
ビットの深さ	: 24 bit(RGB)
ファイル形式	: Portable Network Graphics (PNG)
解析画像数	: 14枚 (未分化、分化ステージごとに各2枚)

学習アルゴリズム

Cell Pocketの深層学習アルゴリズムはセマンティックセグメンテーションを採用しています。本アルゴリズムではあらかじめ学習したラベルに対して、画像中の各画素に対していずれかのラベル付けを行うアルゴリズムです。

本ケースにおいては、図4に示すように「①スフェロイド」「②スフェロイドの輪郭」「③背景」のラベルを教師画像に対して設定し、未知の画像に対して、①～③のいずれの領域かを識別する学習済モデルを作成します。ここでは学習済モデルが学習・識別する対象の画像をターゲット画像、そのラベル情報の画像をラベル画像と呼称します。なおラベルデータはハンドラベリングにより作成しました。

作成された学習済モデルは図5に示すように、スフェロイドの領域を推定します。

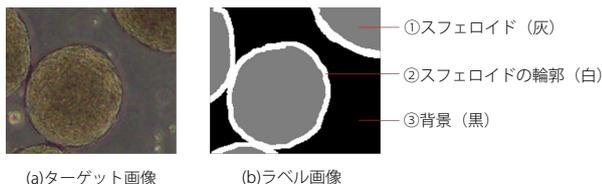


図4 ターゲット画像とラベル画像

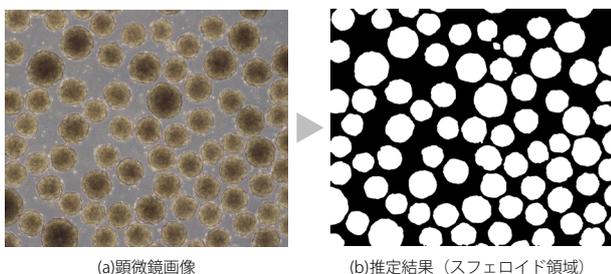


図5 学習済モデルの推定結果

データセット

学習および学習済モデルの精度検証・性能評価を行うターゲット画像とラベル画像の組合せをデータセットと呼びます。データセットは学習に用いる画像群Train dataと学習時に精度評価を行う画像群Validation data、最終的に学習済モデルの性能評価を行う画像群Test dataの3群をまとめたものです。本ケースにおけるデータセットの詳細を表2に示します。なお、データのセットの画像は表1に示した解析対象画像と、類似の培養条件で培養した細胞スフェロイドを撮影した画像から一部の領域を抜き出したものとなっています。データセットの一部を図6に示します。

表2 データセット詳細

画像サイズ	: 197 x 165 pixels
ビットの深さ	: 24 bit (RGB)
ファイル形式	: Portable Network Graphics (PNG)
画像数	: 95枚 (Train:60, Validation:22, Test:13)

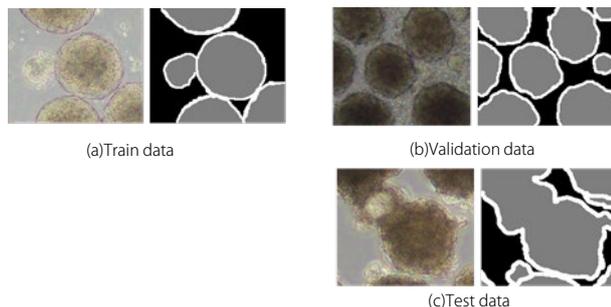


図6 データセット

学習結果

学習曲線を図7に示します。横軸は学習の繰り返し数、縦軸はTrain data・Validation dataにおけるエラー率、または損失関数の出力値を示します。赤ラインが損失関数の出力値、青ラインと緑ラインがそれぞれTrain dataとValidation dataのエラー率となっています。本学習において、損失関数は cross entropyが設定されており、この値が最小値となるように学習が進行します。学習の繰り返し数の増加に伴い損失関数が低下、収束し、Train data、Validation dataのエラー率も同様の傾向であることから問題なく学習が進行しているものと考えられました。



図7 学習曲線

テストデータ13枚における学習済モデルの性能評価結果を表3に示します。各評価指標値の補足を図8に示します。

スフェロイド領域はIoUの値が0.9を超えており、スフェロイドの領域を十分な精度で認識できていると考えられました。図9にテストデータにおけるスフェロイド領域の認識結果を示します。ここでは、スフェロイド領域と認識した領域を元画像に青色でオーバーレイし、画像端に輪郭が触れていない場合のみ青色の輪郭線を表示しています。

スフェロイド領域の輪郭部分を除いた内部の領域をたたく認識できており、スフェロイドの輪郭領域を除いたことで、接しているスフェロイドを個々に認識できていたことが確認できました。

表3 学習済モデルの性能評価結果

評価指標	全体平均	背景領域	スフェロイド領域	スフェロイドの輪郭領域
Accuracy	: 0.954	-	-	-
IoU	: 0.798	0.873	0.930	0.590
Precision	: 0.874	0.922	0.959	0.742
Recall	: 0.895	0.950	0.982	0.753

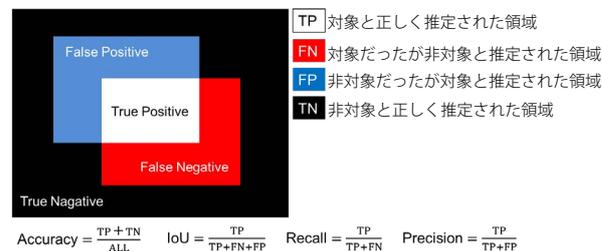


図8 評価指標に関する補足

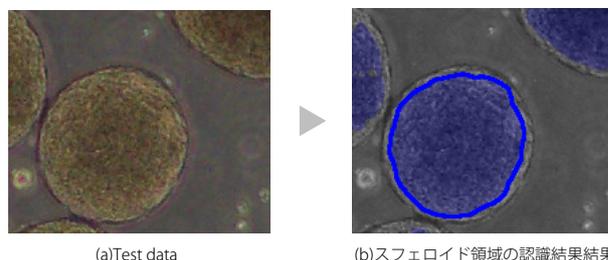


図9 テストデータのスフェロイド領域の推定結果

■解析フロー

Cell Pocketでは学習済モデルと画像処理を含む各種解析処理を組合せた解析フローを「解析レシピ」として登録できます。ここでは各スフェロイドの面積と真円度の分布を可視化するため、図10に示す解析フローを作成しました。

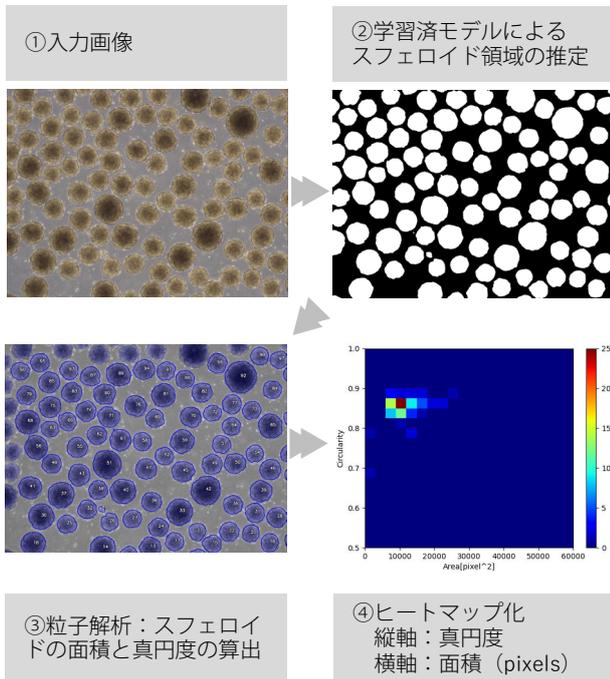


図10 解析フロー

また粒子解析では「解析対象である粒子（本稿ではスフェロイド）」の面積と真円度の他、周囲長や外接矩形の長軸長さ・短軸長さ・アスペクト比・角度、輝度の平均値・分散、色味などの情報を抽出できます。

各分化ステージの粒子解析結果の「周囲長、外接矩形のアスペクト比、輝度の平均値および分散、色味」の指標を用いてt-SNE法により次元圧縮を行い、各分化ステージのスフェロイドの形態的な差異を持つかを検討しました。

■解析結果

粒子解析により各分化ステージでの面積と真円度の分布を視覚化した結果を図11に示します。未分化な状態のスフェロイドでは面積（≒大きさ）や真円度が均一であったのに対し、分化ステージ2, 5では真円度が大きくばらついていることが視覚化されました。また、それらの前段階である分化ステージ1, 4の段階から徐々に真円度の低いスフェロイドが生じているのも確認できました。対照的に分化ステージ3ではスフェロイドの面積・真円度ともに均一な状態であることが分かりました。このように形態変化の変遷を視覚化することで、本来の培養と異なる形態的な変化があった際にリアルタイムに確認することができます。

図12では粒子解析で得られた個々の形態情報をt-SNE法で次元圧縮した結果を示しています。各分化ステージのスフェロイドごとに色付けされており、未分化状態、あるいは各分化ステージごとにクラスタが形成されていることが確認できました。

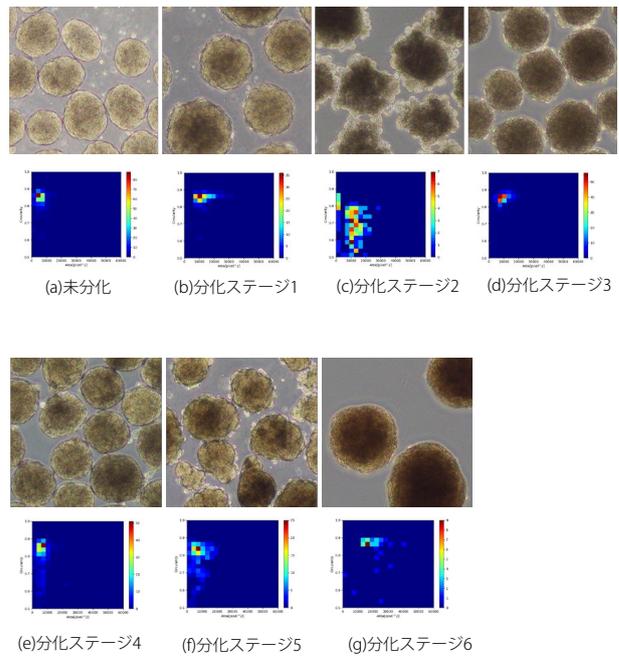


図11 細胞スフェロイドの各分化ステージごと面積と真円度の分布

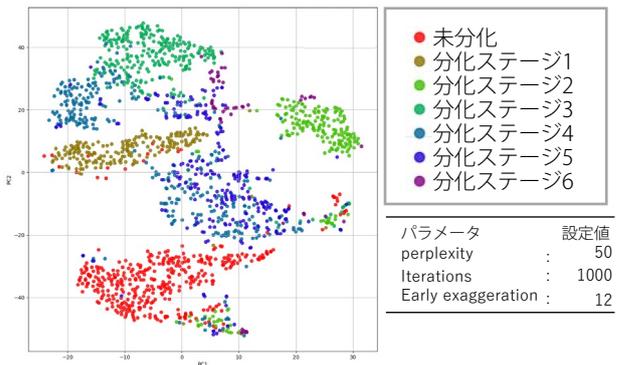


図12 粒子解析結果のt-SNE法による次元圧縮

■まとめ

臓器分化させたヒトiPS細胞スフェロイドを対象に、Cell Pocketによる形態解析を行いました。学習対象の画像から一部を切り出して学習用データを作成し、スフェロイド領域を識別する学習済モデルを作成しました。学習済モデルで推定されたスフェロイド領域に対して、粒子解析を行うことで、各スフェロイドの形態情報を抽出しました。各分化ステージのスフェロイド形態指標の分布をヒートマップで表示することで形態指標の変遷を視覚化することができました。さらに粒子解析解析で得られた形態情報をt-SNE法によって次元圧縮することで各分化ステージごとにクラスタが形成されていることが確認できました。これらの形態解析結果は細胞の培養状態を非侵襲に評価する方法として有効であると考えられます。

最後に本稿で解析対象とした画像データのご提供、分析結果に関する貴重なご意見をいただいた東京工業大学 桑・白木研究室の桑 昭苑先生、白木 伸明先生に感謝を申し上げます。

Cell Pocketは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



関連分野

▶ 細胞解析

▶ 細胞培養 - 医薬品

▶ 臨床研究・法科学

▶ 臨床研究

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ