

修士論文

遺伝的プログラミングを用いた  
画像セグメンテーションによる  
培養角膜内皮細胞の  
特徴量抽出システムの提案

同志社大学大学院 生命医科学研究科  
医工学・医情報学専攻 医情報学コース  
博士前期課程 2012年度 1022番

布川 将来人

指導教授 廣安 知之教授

2014年1月24日

## Abstract

This thesis presents a system for feature value extraction using cell image segmentation algorithm in cultured corneal endothelial cell images. A proposed algorithm can perform cell image segmentation with high accuracy by automatically constructing an optimal combination of image-processing every image. The existing image segmentation methods and cell image analysis software need to set up the parameter fitted for every image, and knowledge of computer image processing is required for image analysis. A burden of the researcher in other fields is great when they analyze the cell images. Therefore, it is expected that the proposed method can reduce burden of users who analyze the images. In this thesis, we made two experiments to verify the efficiency of proposed algorithm for 10 cultured corneal endothelial cell images. The image-processing filter derived by the proposed algorithm is applied the cell image which is same specimen of learning data, and the robust performance of the derived filter is verified. The result showed high robust performance and segmentation accuracy equal to or higher than ImageJ, which is the existing image analysis software, in all cell images.

# 目次

<b>1</b>	<b>序論</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>角膜内皮再生医療</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>進化計算を用いた画像処理フィルタ構築手法</b>	<b>4</b>
3.1	画像処理フィルタの自動構築 . . . . .	4
3.2	遺伝的プログラミング . . . . .	4
3.3	多目的最適化手法 . . . . .	6
<b>4</b>	<b>培養角膜内皮細胞からの特徴量抽出システム</b>	<b>9</b>
4.1	システム概要 . . . . .	9
4.2	学習画像作成支援アルゴリズム . . . . .	9
4.3	細胞画像領域分割の多目的問題への定式化 . . . . .	10
4.4	画像処理による特徴量抽出 . . . . .	12
<b>5</b>	<b>提案システムの有効性の検証</b>	<b>13</b>
5.1	実験概要 . . . . .	13
5.2	学習データにおける細胞画像領域分割結果 . . . . .	14
5.3	全体の細胞画像における細胞画像領域分割結果 . . . . .	14
5.4	特徴量の抽出結果 . . . . .	15
<b>6</b>	<b>結論</b>	<b>16</b>

# 1 序論

近年、失明の要因である角膜損傷や角膜減少などの問題を解決するために角膜内皮再生医療が注目されている。再生医療とは疾病や外傷などによって失われた生体の機能を、幹細胞や前駆細胞などの増殖機能をもった細胞やそれらを培養した組織を用いて治療を行う医療である<sup>1)</sup>。角膜再生医療では、角膜内皮細胞が損傷した患者に体外で培養された角膜内皮細胞を移植することによって治療が行われる。培養の元となる細胞は患者の正常な部分の細胞か、ドナーの細胞を用いる。その際に用いられる角膜内皮細胞の培養状態が良好であるかを確認するために、細胞の品質評価が必要とされる。角膜内皮細胞の品質評価では、細胞の密度や、大きさのばらつき、形状などの特徴量が重要な指標となる。しかしながら、正常時の角膜内皮細胞の密度は、2000~2500 個/mm<sup>2</sup> であり、目視によって各細胞の特徴量を判断することは困難である。また、培養状態の判断は研究者の知識や経験によるものが大きいといった問題も挙げられる。そのため、細胞の状態を定量的に評価することが求められている。

細胞状態の定量的評価のために、撮像された細胞画像を解析する方法が主に行われており、ImageJ<sup>2)</sup> や CellProfiler<sup>3)</sup> などの細胞画像解析ソフトウェアが開発されている。そもそも細胞の特徴量を計測するためには、前処理として細胞画像における細胞領域の抽出を行う必要がある。これは ImageJ や CellProfiler を用いた場合でも同様であり、特徴量計測の前処理として、ソフトに含まれる複数の画像処理フィルタを使用者が組み合わせ、細胞領域抽出を行う。また、これまでに考案されている細胞画像の領域を抽出するための領域分割手法は、精度向上のために対象の画像に依存したパラメータを設定しており、対象画像ごとに適切なパラメータに変更する必要がある。そのため、既存の細胞画像の解析方法は使用者の手間を労するものであり、特にコンピュータ画像処理の知識の獲得は分野の異なる再生医療研究者にとって大きな負担となっている。このような背景から、本論文では、角膜再生医療研究者の培養細胞の品質評価の支援を目的とし、特別な画像処理の知識を必要とせず、細胞の品質評価に用いる細胞の密度や、形状といった特徴量を抽出するシステムについて提案する。

一般的に目的の画像を得るためのアプローチとして、新たにその画像処理アルゴリズムを考案する方法と、既存の画像処理フィルタを組み合わせる方法がある。前者の場合、目的に特化した処理を行うことができるが、汎用性が低く、処理対象が変わると精度が著しく低下することが多い。後者の方法で重要になるのは、画像処理フィルタの組み合わせを決定する方法であるが、この組合せの数は膨大である。そこで、後者のアプローチに対して、遺伝的プログラミング (Genetic Programming : GP)<sup>4)</sup> を用い、最適な組合せを求める手法が青木ら<sup>5)</sup> によって考案されており、PET (Positron emission tomography) 画像の肝臓画像領域抽出や口腔癌病理画像の癌巣領域抽出などにも応用されている<sup>6)7)</sup>。しかしながら、この GP を用いた最適化においてもいくつかのパラメータが探索性能に影響を及ぼすため、パラメータの設定を対象問題毎に変更する必要がある<sup>8)</sup>。そこで本論文では、GP を用いた画像処理フィルタ構築手法をベースとし、位相差顕微鏡によって撮像さ

れた培養角膜内皮細胞画像を対象とした領域分割問題に特化したシステムを提案する。また、GP の代わりに多目的 GP を用いることで先述した GP の問題を解決する。

本論文の構成を以下に示す。第 2 章で角膜再生医療の現状について述べ、第 3 章で青木らによって考案された遺伝的プログラミングを用いた画像処理フィルタ構築手法と GP 及び多目的 GP について述べる。そして、第 4 章では、提案システムの概要と、細胞画像領域分割問題に特化した多目的 GP の設計、特徴量の抽出方法について述べ、第 5 章で提案手法の有効性を検証する。最後に、第 6 章で結論を述べる。

## 2 角膜内皮再生医療

角膜は上皮細胞層、実質層、内皮細胞層から構成されており、眼球の屈折力の約70%を担う透光体として重要な役割を果たしている。また、内皮細胞層はバリア機能とポンプ機能を有することによって角膜実質の含水率を一定に保ち、角膜を透明に維持する極めて重要な機能を持つ。しかしながら、ヒトやサルなどの霊長類では生体内における角膜内皮細胞の増殖能が極めて低いため、病的もしくは外的要因（外傷、ジストロフィ、眼内手術）によって角膜内皮細胞が脱落した場合は、周囲の細胞が拡大・伸展することによって脱落箇所を補填を行う<sup>9)</sup>。正常時の角膜内皮は、密度2000-2500個/mm<sup>2</sup>の六角形を主とする細胞から構成されているが、外傷などに伴う細胞の脱落に対する補填によって、細胞密度が数百個/mm<sup>2</sup>以下になると角膜内皮機能不全に陥る<sup>10)</sup>。現在はこれらの障害に対する治療として、主に全層角膜移植手術が広く行われている。しかし、わが国におけるドナー角膜が不足していることや、角膜移植後の拒絶反応、移植片不全の発症率の高さ、また移植された内皮細胞が手術後減少し、再移植、再々移植を余儀なくされる可能性が高いなど、多くの問題を抱えている。このような医学的および社会的背景のもと、再生医療的アプローチを用いた新しい角膜疾患の治療法の開発が期待され、研究が行われている<sup>1)</sup>。

再生医療とは疾患や外傷などによって失われた生体の機能を、幹細胞や前駆細胞などの増殖能をもった細胞や、それらを培養して得られた組織を用いて治療する医療である。角膜における再生医療に関しては、1990年代には既に生体外での培養が困難であったヒト角膜内皮細胞の培養が可能になり、2000年代に入ってから、培養した角膜内皮細胞を移植する試みがウサギを用いた動物実験で報告されている<sup>11)</sup>。さらに近年では、小泉らがヒトへの臨床応用を目指し、ヒトと同様に生体内における角膜内皮細胞の増殖能が乏しいカンクイザルを対象とした培養角膜内皮シート移植を行っており、その有用性を示唆している<sup>10)</sup>。また西田らは、損傷を与えたウサギ角膜を完全に回復し、ヒトへの応用の成功を報告している<sup>12)</sup>。

一方で再生医療は、医療としてさまざまな安全性基準を満たさなくてはならない。培養細胞が移植に用いられるほど良好であるかの基準はもちろんのこと、培養に用いる医薬品の有効性や安定性などのために、今や「不安定な細胞であっても品質評価ができなければいけない」という時代になっている<sup>13)</sup>。細胞の品質を非破壊的に推察する情報として培養中の細胞の形態的特徴が重要であることが経験的によく知られており、角膜内皮細胞においては先述の通り、密度（個々細胞の大きさと数）、形状（六角形）が必要とされる。また、これら形態的特徴の定量解析のために、コンピュータを用いた培養中の細胞画像の多変量・統計解析に関する研究が行われている。しかし、観察対象の定量解析の前処理として重要である領域分割（領域抽出）は、細胞内観察画像での成功例が極めて少なく、定量解析の妨げとなっている<sup>14)</sup>。その原因の一つに領域分割アルゴリズムの汎用性欠如が挙げられ、高精度での領域分割が求められる場合、対象に特化したアルゴリズムが必要である。そのため対象ごとにアルゴリズムの決定やパラメータ調整が求められる、前処理であるにも関わらず領域分割が、形態的特徴の定量解析における大きな問題とされている。

## 3 進化計算を用いた画像処理フィルタ構築手法

### 3.1 画像処理フィルタの自動構築

画像処理フィルタの自動構築を行うために、青木らは Automatic Construction of Tree-structure Image Transformation (ACTIT) を提案している<sup>15)</sup>。ACTIT は、進化計算の一つである遺伝的プログラミングを用いて最適な画像処理フィルタの組合せを導く手法である。一般的に複雑な画像処理（変換）も既知の単純な画像処理フィルタを組み合わせることで表現することができると考えられる。そこで、画像処理構築の問題を既知の画像処理フィルタの組合せ最適化問題と捉え、その最適化問題の解を求めることで、Fig. 1 に示すような木構造状フィルタを構築する。

複雑な処理が必要とされる画像処理でも、このように最適化問題に定式化することで、対象画像の特性を意識することなく、最適な画像処理フィルタを構築することが可能となる。

Fig. 1 に示すような木構造フィルタを構築するために、学習データである入力画像  $I$  と入力画像に対して理想的な処理を行った画像である目標画像  $T$  のセットと、複数の既知の画像処理フィルタを用意する。そして入力画像を目標画像へ近似するように、既知の画像処理フィルタに対して組合せ最適化を行い、木構造フィルタが構築される。この木構造フィルタでは、終端ノード  $I$  から画像が入力され、各非終端ノードに格納された既知フィルタの処理を順に行うことで、1枚の出力画像  $O$  を作成する。

ACTIT では、構築された木構造フィルタの評価に出力画像と目標画像の各ピクセル値の一致度を用い、組合せ最適化の対象となる既知のフィルタには平滑化やエッジ抽出などが用いられている。しかし、本論文で扱う細胞画像の領域分割においては、細胞の数や形状を正確に分割できているかが重要な評価基準となる。また、細胞画像における領域分割を行うために、平滑化やエッジ抽出などの単純な画像処理フィルタのほかに様々な領域分割フィルタが考案されている<sup>16)</sup>。そこで、本論文では ACTIT の考え方にに基づき、木構造の評価や、用意する既知フィルタをより細胞画像の領域分割に特化させた手法を提案する。詳細については4章に示す。

### 3.2 遺伝的プログラミング

遺伝的プログラミング (Genetic Programming: GP) は、生物の進化の過程を模倣した最適化手法である遺伝的アルゴリズム (Genetic Algorithms : GA)<sup>17)</sup> の遺伝子型 (Fig. 2) を木構造、グラフ構造といった構造的な表現 (Fig. 2) で扱えるように拡張した手法である<sup>4)</sup>。構造を遺伝子型で表現することにより知識表現の獲得や関数・プログラムの自動生成などの階層的な表現能力を要する問題を直接的に扱うことができるといった特徴を持つ。GP では、Fig. 2 のような個体が集まった母集団に対して遺伝的操作（選択，交叉，突然変異など）を繰り返すことで、問題に適した良好な個体（解）を生成する。GP のアルゴリズムを以下に示す。

#### (1) 初期集団の木構造の生成

あらかじめ設定した木の深さを越えない複数の個体をランダムに生成し、初期個体群（母集団）とする。各個体は終端記号と非終端記号を組み合わせた木構造で表す。

## (2) 評価

対象問題の評価関数によって、各個体の評価値を求める。対象とする問題の解として適する個体ほど評価値が高くなるよう、問題に応じた評価関数が用いられる。

## (3) 選択

各個体の評価値を判断基準にして、次世代に残す個体を選択する。本論文では、母集団の中からランダムに選択した一定数の個体の中から、評価値が最も高い個体を選択して次世代に残すトーナメント選択を用いる。

## (4) 交叉

個体の構造に変化を加える中心的な操作である。母集団中の個体に対して、交叉率に応じて交叉を行う個体のペア（親）をランダムに選出する。親1と親2の交叉点をランダムに選び、それぞれ交叉点に応じた部分木同士を交換することで、新しい子個体を生成する（Fig. 3）。

## (5) 突然変異

母集団中の個体に対して、突然変異率に応じて突然変異を行う個体をランダムに選出する。そしてランダムに突然変異点を選び、その点に応じたランダムに生成した部分木と突然変異木を入れ替える（Fig. 3）。ここで、部分木の作成には、(1)の初期個体の生成と同様の処理を行う。ただしルートノードは突然変異の対象外である。

## (5) 終了判定

終了条件に達するまで、(2)~(5)の遺伝的操作を繰り返す。終了条件には、最大世代数や、目標評価値などを与える。本論文では、設定した世代数に到達すれば終了とする。

またGPでは、解の探索過程においてプログラムサイズ（木構造）が増大するブロートと呼ばれる現象が発生することが報告されている<sup>18)</sup>。ブロートが発生することによって、探索時間の増加や効率的な解探索の阻害、解の過学習などの問題が生じる。このブロートを抑制するための手法として、木の深さやサイズ（ノード数）の上限を制限する方法や、個体評価の際にサイズが大きい個体ほどペナルティを付与する方法が用いられている。

しかしながら、深さの制限やペナルティの最適なパラメータは問題毎に異なっているため、GPを用いる際に任意に設定する必要がある、このパラメータが探索性能に影響を及ぼすという報告が行われている<sup>8)</sup>。そこで本論文では、多目的最適化手法を用いることで深さの制限やペナルティに頼ることなく、ブロートを抑制しつつ、木のサイズ毎の木構造の最適化を行う。多目的最適化手法については次節に示す。

### 3.3 多目的最適化手法

多目的最適化とは、一つの評価基準（目的）のみの最適化を行うのではなく、複数の評価基準がある問題の最適化、つまり多目的最適化問題を最適化する際に用いる手法である。多目的最適化問題では、一つの最適化したい対象（設計変数）に対して複数の評価基準が存在し、かつほとんどの場合、それら複数の評価基準がトレードオフ関係にあるため、全ての評価基準において高い評価を持つ解を得ることは困難である。これは、トレードオフ関係によって一方の評価の改善が他方の評価の改悪となってしまうからである。そのため、多目的最適化手法ではパレート最適解と呼ばれる解の集合を用いて解の探索を行う<sup>19)</sup>。パレート最適解とは「ある評価基準の値を改善するためには、少なくとも他の1つの評価基準の値を改悪せざるを得ないような解」の集合である。目的関数（評価基準）を2目的最小化問題とした場合のパレート最適解を Fig. 4 に示す。

本論文では、木構造の最適化を木のサイズと木構造から得られた評価値との間にトレードオフ関係を持つ多目的最適化問題とみなし、多目的最適化手法を用いる。木構造最適化の多目的問題への定式化に関する詳細は4章にて述べる。また、多目的最適化手法としては NSGA-II を用いる。

#### 3.3.1 NSGA-II

非優越ソート GA-II(Non-dominated Sorting Genetic Algorithm II: NSGA-II)<sup>20)</sup> は GA を多目的最適化問題に適用できるように拡張させた手法のひとつである。NSGA-II の特徴としては以下の点があげられる。

- (1) 非優越ソートを用いた個体（解）へのランク付け
- (2) 外部アーカイブを用いた非優越解の保存
- (3) 混雑距離 (Crowding Distance) を用いた混雑度トーナメント選択 (Crowded Tournament Selection Operator)

以下、NSGA-II のアルゴリズムの流れ、非優越ソートを用いたランク付け、混雑度トーナメント選択、混雑距離について説明する。

#### アルゴリズムの流れ

NSGA-II では、保存する母集団  $P_t$  と交叉・突然変異といった遺伝的操作を用いた探索を行うための母集団  $Q_t$  の2つの独立した母集団を用いて解探索を進めていく。具体的には、まず世代  $t$  における親母集団  $P_t$  から遺伝的操作を用いた探索を行うための子母集団  $Q_t$  を選択する。 $Q_t$  に対して各遺伝的操作を行い  $Q_t$  を更新する。次に、各遺伝的操作を行った  $Q_t$  と親母集団  $P_t$  を組み合わせた  $R_t = P_t \cup Q_t$  を生成し、選択操作によって個体数  $2N$  の  $R_t$  から個体数  $N$  の  $P_{t+1}$  を新たに選択し探索を進めていく。NSGA-II の流れを以下に示す。

**step.1** 親母集団と子母集団を組み合わせる  $R_t = P_t \cup Q_t$  を生成する。  $R_t$  に対して非優越ソートを行い、全個体をフロント毎 (ランク毎) に分類する:  $F_i, i = 1, 2, \dots, etc.$

**step.2** 新たな母集団  $P_{t+1}$  を生成。変数  $i = 1$  とする。

$|P_{t+1}| + |F_i| < N$  を満たすまで、  $P_{t+1} = P_{t+1} \cup F_i$  と  $i = i + 1$  を実行。

**step.3** 混雑度ソート (Crowding-sort) を実行し、最も多様に広がっていた個体  $N - |P_{t+1}|$  個を  $P_{t+1}$  に加える。

**step.4**  $P_{t+1}$  を基に、混雑度トーナメント選択、交叉、突然変異を用いて新たな子母集団  $Q_{t+1}$  を生成する。

このように NSGA-II では、親母集団  $P_t$  と子母集団  $Q_t$  を組み合わせた母集団  $R_t$  の上位  $N$  個体を選択し、次世代の親個体  $P_{t+1}$  としている。また、探索個体 (子個体)  $Q_t$  は、親個体  $P_t$  から混雑度トーナメント選択を用いて選抜されており、親個体  $P_t$  のより優れた個体を用いて各遺伝的操作を用いた探索が行われている。一方、常に優良個体を保存する親母集団  $P_t$  と探索を行う子母集団  $Q_t$  を分けて保持することにより、それまでの探索で発見した優れた解が欠落するのを防いでいる。NSGA-II の親母集団  $P_t$  更新の概念図を Fig. 5 に示す。

非優越ソートを用いたランク付け

非優越ソートを用いたランク付けの流れを以下に示す。

**step.1** ランク  $r = 1$  とする。

**step.2** 個体群 ( $P$ ) の中から非劣個体を求め、これらの個体をランク  $r$  とする。非劣解とは、母集団内の全ての個体に対して、ひとつ以上の目的関数で優越している解を示す。

**step.3** 得られた非劣個体群を個体群  $P$  から除き、  $r = r + 1$  とする。

**step.4** 全ての個体がランク付けされるまで (個体群  $P$  が空になるまで)、Step 2 および Step 3 を繰り返す。

非優越ソートを用いてランク付けを行った結果の概念 Fig. 6 に示す。

混雑度トーナメント選択

混雑度トーナメント選択 (Crowded Tournament Selection Operator) は、各ランク ( $r$ ) により形成されるフロント ( $F_r$ ) が一様に分布するように選択を行っており、トーナメントサイズ 2 のトーナメント選択に基づいた方法である。この選択方法では、全ての解  $i$  に対して次の 2 つの属性を持たせ、それらを選択基準に選択している。

(1) 母集団における非優越ランク ( $i_{rank}$ )

(2) 母集団内の局所的混雑距離 ( $i_{distance}$ )

混雑度トーナメント選択では、 $i$  と  $j$  の 2 個体の優越関係として以下のいずれかの条件を満たす場合に、“ $i$  は  $j$  よりも優れている” と定義している。

- (1) 個体  $i$  のランクの方が個体  $j$  のランクよりも優れている:  $(i_{rank} < j_{rank})$
- (2) 個体  $i$  と  $j$  はともに同じランクであり、 $i$  の混雑距離が  $j$  よりも優れている:  $(i_{rank} = j_{rank})$  and  $(i_{distance} > j_{distance})$

### 混雑距離

混雑距離 (Crowding Distance) とは、ある個体  $i$  の周りにおける個体の密度を評価するための手法である。混雑距離は、同一ランク (同一フロント内) 同士で用いられ、各目的関数軸において隣り合う個体間との距離を足し合わせたものである。混雑距離の概念図を Fig. 7 に示す。以下に混雑距離を計算するアルゴリズムを示す。

**step.1** フロント  $F$  (同一ランクの個体集団) に含まれる個体の数を変数  $l$  に代入する ( $l = |F|$ )。また、このフロントに含まれる各個体  $i$  に対して初期値設定を行う ( $d_i = 0$ )。

**step.2** 各目的関数  $m = 1, 2, \dots, M$  に対して、目的関数値が悪い順に個体をソートする ( $I^m = \text{sort}(f_m, >)$ )。

**step.4** 各目的関数  $m = 1, 2, \dots, M$  に対して、まず境界個体 (目的  $m$  の最大値と最小値の個体) に対して最大距離、もしくは無限距離を与える  $d_{I_1^m} = d_{I_l^m} = \infty$ 。さらに境界個体以外の全ての個体 ( $j = 2, \dots, l - 1$ ) に対して式 (3.1) に従った混雑度計算を行う。

$$d_{I_j^m} = d_{I_j^m} + \frac{f_m^{I_{j+1}^m} - f_m^{I_{j-1}^m}}{f_m^{\max} - f_m^{\min}} \quad (3.1)$$

## 4 培養角膜内皮細胞からの特徴量抽出システム

本章では、3章の手法に基づき、より細胞画像領域分割に特化したアルゴリズムを用いることで、細胞培養の評価に必要な特徴量を抽出できるシステムの提案を行う。4.1節では、提案するシステムの概要のについて、4.2節では、システムで用いる学習画像の作成支援アルゴリズムについて述べる。4.3節では、多目的GPをベースとした3章の手法を細胞領域分割に適応させた方法に関して述べる。4.4節では、提案アルゴリズムによって得られた領域分割結果（画像）から、培養状態の指標となる特徴量の抽出方法について述べる。

### 4.1 システム概要

本システムは特別な画像処理の知識を必要とせず、位相差顕微鏡によって得られた角膜内皮細胞画像から細胞の品質評価で用いる特徴量（細胞の密度、形状など）を抽出することを目的としている。細胞画像から特徴量の抽出を行う流れを以下に示す。

**step.1** ユーザによる細胞画像からの学習画像の作成

**step.2** 学習画像を用いた画像処理フィルタの構築

**step.3** 画像処理フィルタの細胞画像への適用

**step.4** 領域分割画像からの特徴量の抽出及びユーザへの提示

本システムの概要を Fig. 8 に示す。

step.1 では、領域分割アルゴリズムである Watershed アルゴリズム<sup>21)</sup> をベースとした処理を用いることで、学習画像作成に伴うユーザ負担の軽減を行う。step.2 では3章の手法に対して、細胞領域分割への適応と多目的GPの導入を行う。step.3 では多目的GPを用いることで一度に複数の画像処理フィルタを得ることができるため、複数の領域分割結果の候補をユーザに提示し、最適なフィルタを選択することが可能となる。step.4 ではstep.3 で得られた領域分割結果から、品質評価の定量的な指標となる特徴量の抽出を行う。各stepにおける詳細については次節以降にて示す。

### 4.2 学習画像作成支援アルゴリズム

GPもしくは多目的GPを用いて画像処理フィルタを作成するためには、フィルタの最適化を行うための学習画像（学習データ）が必要となる。本システムにおける学習画像は Fig. 9 に示すような、細胞画像の領域と境界をはっきり区別可能な画像が必要であり、このような学習画像はユーザが自らペイントソフトなどを用いて作成する必要がある。

本節では、この学習画像作成の際のユーザ負担を減少させるための支援アルゴリズムについて述べる。

本アルゴリズムを用いた学習画像作成の手順を以下に示す。

- (1) ユーザが全体の細胞画像から学習画像に用いる領域を選択する。

- (2) 選択した領域に存在する各細胞の中心に、ユーザが点をプロットする。
- (3) プロットされた点をベースとし、システムが学習画像を作成する。

本アルゴリズムでは画像の領域分割に用いられる手法の一種である Watershed アルゴリズム<sup>21)</sup>をベースとする。Watershed アルゴリズムは、マーカと呼ばれる領域の核を複数設定し、核を隣接画素へと広げていくことによって領域を得る手法である。グレースケール画像における Watershed アルゴリズムの概略を Fig. 10 に示す。

- (1) 近傍における輝度勾配の各極小値にマーカを設定する。
- (2) 勾配に沿ってマーカを広げる。
- (3) マーカのぶつかったところに境界を生成する。

上記の処理によって、それぞれの細胞領域の一部が結合しているような画像に対しても、細胞の中心の輝度が極小値となっていれば各細胞領域を分割することが可能となる。一方、本論文で扱う細胞画像は、位相差顕微鏡から撮像されるものであり、画像の輝度値は撮像時の光環境によって異なる。そのため、細胞領域の境界の輝度勾配が小さいような画像の場合は、上述の Watershed アルゴリズムでは望まれる領域分割結果が得られないことが考えられる。そこで、領域の輝度勾配ではなく、領域の形状を利用した shaped Watershed アルゴリズムも導入する。アルゴリズムの処理の流れを Fig. 11 に示す。

Fig. 11(a) では、各細胞の中心の輝度が結合している細胞の境界の濃度よりも高いものが存在する。そこで、各細胞が円形に近い形状であることに着目する。その場合、まず二値化によって、背景と細胞領域を区別する (Fig. 11(b))。そして、二値画像を背景からの距離画像に変換する (Fig. 11(c))。距離画像では、各領域のピクセルの濃度値は背景ピクセルまでの最も近い距離に相当する。この距離画像の輝度値を勾配にみたてた場合、各領域の中心ほど輝度値が低くなっており、距離画像に対して Watershed アルゴリズムを適用することで、Fig. 11(d) に示すような領域分割を行うことが可能となる。

本アルゴリズムでは、ユーザがプロットした点を Watershed アルゴリズムで用いるマーカとし、領域分割を行う。また、点をプロットする前の画像に対して shaped Watershed アルゴリズムを適用し、加算平均を行うことで、細胞画像の濃度情報とユーザのプロットした点の情報を考慮した学習画像の作成を行う。

### 4.3 細胞画像領域分割の多目的問題への定式化

本節では、細胞領域分割のための画像処理問題を遺伝的プログラミングを用いて解決するために、問題の定式化の方法として、設計変数となる細胞領域分割に適した画像処理フィルタ及び領域分割の指標を用いた評価関数について述べる。

#### 4.3.1 設計変数

これまで画像の領域分割に関する研究は数多く行われており、エッジ検出法や K 平均クラスタリング、Watershed アルゴリズムなど様々な領域分割の方法が考案されている<sup>22)</sup>。

その中でも細胞画像領域分割には前節で述べた Watershed アルゴリズムが用いられており、画像解析ソフトウェアである IamgeJ や CellProfiler においても Watershed 処理が実装されている。

本論文では、設計変数（非終端ノードに格納する既知の画像処理フィルタ）として青木ら<sup>15)</sup>が用いていた一般的な画像処理フィルタと細胞画像領域分割のための Watershed を用いる。使用する画像処理フィルタを Table 1 に示す。

Table 1 において、f1~f13 は 1 入力、F1~F4 は 2 入力の画像処理フィルタであり、木構造の終端記号には、グレースケール化を施した入力画像が格納される。

#### 4.3.2 評価関数

画像の領域分割の定量的な評価は、ground truth（正しく分割された画像）に対する分割個数や領域の形状、境界のずれなどの要素をどの程度許容するかによって変わってくる。そのため、Rand index (RI) や Variation of Information (VOI), Global Consistency Error (GCE), Boundary Displacement Error (BDE) といった多くの領域分割の評価指標が提案されている<sup>16)</sup>。特に GCE は ground truth に対する領域分割数と各領域の詳細（ピクセル数）が近似している場合に評価値が高くなるように表現されている。そのため、培養角膜炎細胞の品質を評価する上で重要な要素である密度と形状を抽出する際の評価に適しており、多くの研究で GCE が細胞領域分割の評価に用いられている<sup>23)</sup>。このことから、構築した木構造フィルタにおける画像領域分割の評価関数として、本論文では GCE を用いる。GCE は、2 つの分割画像  $S1, S2$  に対して、画素  $x_i$  を含む領域 ( $R(S1, x_i); R(S2, x_i)$ ) ごとのピクセル数の誤差（局所的詳細誤差）で表される。局所的詳細誤差  $E$  は式 (4.1) のように定義される。

$$E(S1, S2, x_i) = \frac{|R(S1, x_i) - R(S2, x_i)|}{|R(S1, x_i)|} \quad (4.1)$$

画像内の全ての領域ごとの局所的詳細誤差を調べることで、画像全体の分割精度 (GCE) を定量的に評価する。GCE は、 $N$  を画素数として式 (4.2) として定義される。

$$GCE(S1, S2) = \frac{1}{N} \min \left\{ \sum_i E(S1, S2, x_i), \sum_i E(S2, S1, x_i) \right\} \quad (4.2)$$

また、3.2 節でも示したとおり、設計変数が木構造となる最適化問題においては、木のサイズが探索の性能や評価の時間に大きく関わってくる。そのため、高い評価値（領域分割の精度）を有しつつ、サイズが小さな木構造を得ることが最良であると考えられる。そこで本論文では先述の GCE に加え、木の深さを評価関数として用いることで、木のサイズの膨大化を抑えつつ、高い評価値を持った木構造の探索を行う。3 章の手法に対して GP を多目的最適化手法に適用した多目的 GP を用いることで、これを実現する。また、GP を用いた場合には一つの最適な結果しか得られないのに対して、多目的 GP では木のサイズ毎に最適な結果が得られるため、一度の探索で複数の領域分割結果を得ることが可能となる。そのため、複数の領域分割結果から、再生医療の専門家であるユーザが最も良好だと判断する画像処理フィルタを選択することで、ユーザの求める結果により近似した領域分割を実現することが可能となる。

#### 4.4 画像処理による特徴量抽出

提案システムでは多目的 GP によって得られた領域分割結果から細胞の数，各細胞の大きさ，形状の抽出を行う．抽出の方法としては主にラベリング処理を用いる<sup>24)</sup>．ラベリング処理によって各細胞（領域）に異なるラベルを付与することで，細胞の数と，各細胞の大きさを抽出する．角膜内皮細胞においては六角形に近い細胞ほど正常な細胞と判断されるため，各細胞が六角形かどうかを判別し，全体の細胞数に対して六角形の細胞がどの程度存在するか（六角形細胞率）を形状の特徴量として抽出する．六角形の判別には各細胞の頂点を用いる．各細胞の境界と隣接している画素を走査していき，頂点となるピクセルを探索する．細胞内に頂点が6個存在する場合，その細胞を六角形であると判断する．六角形の判別の流れを Fig. 12 に示す．これらの特徴量を抽出，提示することで培養細胞の品質評価の支援へと繋がる．

## 5 提案システムの有効性の検証

### 5.1 実験概要

本章では、細胞画像領域分割問題に対して4章で提案した手法を適用し、提案手法の有効性を検証する。また、有効性の検証のために2つの実験を行う。

実験1では、細胞画像の一部の領域を切り取った学習データから画像処理フィルタの構築を行い、学習データに基づく領域分割が可能であるか検証する。対象画像は、10種類の培養角膜内皮細胞画像であり、各画像において領域分割のための画像処理フィルタを構築し、その精度を確認する。実験で使用する対象画像を Fig. 13 に示す。

対象画像は、カニクイザルから採取した角膜内皮細胞に10% FBS（ウシ胎児血清）と2ng/ml bFGF（ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子）を用いて培養した細胞をPBS（リン酸緩衝材生理食塩水）で洗浄し余分な培地を取り除き拡大したものであり、それぞれ検体が異なる<sup>25)</sup>。これらの画像は同志社大学生命医科学部医工学科ティッシュエンジニアリング研究室から提供された画像である。また、全ての画像は倍率200倍で撮像された画像であり、画像サイズは348 × 260 [pixel] である。Im(image)1~5は培養状態が不良、Im6~10は良好であると角膜再生医療研究者によって判断されたものである。各画像において領域分割を行う画像処理フィルタを構築するために、本実験では対象画像から100 × 100[pixel]の領域を切り取り、学習データの入力画像とする。使用する各学習データセットを Fig. 14 に示す。学習データセットの目標画像は、細胞領域を黒、細胞の境界を白でマークしたものである。領域分割の精度評価には、4.3.2項で述べたGCEを用いる。性能の検証として、多目的GPと単目的のGPそれぞれによって得られた構築フィルタの評価値を用いて比較を行う。

実験2では、実験1で構築した領域分割のための画像処理フィルタを学習データと同一検体である細胞画像（Fig. 13）に適用し、構築した画像処理フィルタの汎用性能について検証する。本検証において、画像全体の分割結果の評価を行うことは難しいため、汎用性能の評価として、入力画像とは異なる100 × 100 [pixel]の2ヶ所の領域における精度の平均値を用いる。また、汎用性能の検証のために、ImageJで領域分割を行った結果と比較する。ImageJは、アメリカ国立衛生研究所で開発された医療画像の解析用に作られた画像処理ソフトウェアである<sup>2)</sup>。ImageJでは入力画像に対して、順にグレースケール化、平滑化（Gaussian）、二値化、Watershed処理を行う。この一連の処理は、ImageJのUser Guideにおいて、細胞画像領域分割を行う際に推奨されている手順である<sup>26)</sup>。本実験で使用する多目的GP(NSGA-II+GP)及び単目的GPのパラメータをTable 2に示す。

多目的GP及び単目的GPは各学習データごとに10回実行し、構築された10種類の画像処理フィルタの精度の平均値を用いて検討する。最後に、本システムによって得られた細胞画像の特徴量について示す。

## 5.2 学習データにおける細胞画像領域分割結果

それぞれ対象の学習データから構築した木構造の画像処理フィルタの一例を Fig. 15 に、構築した画像処理フィルタから得られた領域分割画像を Fig. 16 に示す。Fig. 16 において MOGP は多目的 GP を示し、複数得られたフィルタの中で、5 番目（中央値）に精度が良好であるフィルタを用いた結果である。

Fig. 16 に示した各画像の領域分割の精度を Fig. 17、全学習データにおける領域分割の精度を平均した結果を Fig. 18 に示す。Fig. 17 において多目的 GP の精度は得られた複数の画像処理フィルタの中の最良値を、Fig. 18 における単目的 GP の結果は木のサイズを考慮せずに、全画像で得られたフィルタの精度を平均した結果を示している。

Fig. 16 の結果から、GP 及び多目的 GP において入力した学習データに対して、領域分割を行えていることが確認できる。Fig. 17 の結果から、全ての画像で多目的 GP が単目的 GP に対して同等以上の精度で学習が行えていることが確認できる。また、Fig. 18 の結果から、多目的 GP で得られた複数のフィルタのうち木の深さが 7 以上であれば、単目的 GP より高い精度の学習が行えていることが確認できる。これらの結果から、本問題の学習の段階において多目的 GP が単目的 GP と同等以上の探索性能を有していることが示唆された。

## 5.3 全体の細胞画像における細胞画像領域分割結果

5.2 節で構築した画像処理フィルタをそれぞれの学習画像と同一検体である画像全体 (Fig. 13) へ適用した結果の画像を Fig. 19, Fig. 20 に、ImageJ によって画像全体の領域分割を行った結果を Fig. 21 に示す。また、GP、多目的 GP、ImageJ の領域分割結果の精度を Fig. 22、全画像における分割結果の精度の平均を Fig. 23 に示す。

Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21 の結果から目視による判断において、どの手法においても画像全体において領域分割が行えていることが確認できる。また、Fig. 22 の結果から、多目的 GP が全ての画像において単目的 GP よりも優れた分割精度を示しており、Im8 以外の画像において ImageJ よりも優れた分割が行えていることが確認できる。また、Fig. 23 の結果から、木の深さが 5 以上のフィルタにおいて、単目的及び ImageJ よりも優れた分割精度を示していることが確認できる。Fig. 22 に示した Im8 の結果において、多目的 GP の精度が劣っていた理由として以下の点が考えられる。まず、Im8 ではどの部分が境界となるのか目視においても判断が難しい領域が複数存在することが確認できる (Fig. 24)。

また、これらの領域が学習画像として選択した領域 (Fig. 14) には含まれていなかったため、画像全体における精度が低くなったと考えられる。この結果は本手法において学習データとして用いる領域の決定が重要になってくることを示している。しかしながら、Im8 においても、ImageJ と多目的 GP の精度の差は 2% 程度であり、同等の性能を示していると言える。

実験 1 及び実験 2 の結果から、細胞画像の領域分割を行う際、多目的 GP を用いることで単目的 GP 及び既存ソフトである ImageJ よりも優れた分割結果を得られる可能性が示

唆された。本実験で得られた領域分割結果から抽出した特徴量について次節に示す。

#### 5.4 特徴量の抽出結果

5.3節の実験で多目的 GP より得られた Fig. 20 の画像から、4.4節の特徴量抽出を行った結果を Table 3 に示す。また、専門家によって不良と判断された Im1~Im5 の特徴量と、良好と判断された Im6~Im10 の特徴量を平均した結果を Table 4 に示す。

Table 3 の結果から、Im3, Im7 以外の細胞画像において、培養状態が不良な画像では細胞数及び細胞密度が低く、培養状態が良好な画像では細胞数及び細胞密度が高いことが確認できる。また、Table 4 の結果から培養状態によって細胞数、細胞密度に差があることが確認できる。しかしながら、Table 3, Table 4 のどちらの結果においても、培養状態による六角形密度の差は見られなかった。これは、今回抽出した六角形が頂点の数、つまり隣接している細胞数のみで決定した形状であり、最も良好とされている正六角形に近いかどうかを判断していないためだと考えられる。しかしながら、この六角形抽出の方法は角膜内皮細胞の特徴量抽出の研究<sup>27)</sup>においても用いられている手法であり、専門家が用いる既存ソフトウェアにおいても用いられているため、妥当な方法であると考えられる。

以上の結果から、本システムで抽出した細胞数、細胞密度を用いて、角膜内皮細胞画像の状態判断を行うことが可能であり、本システムが角膜内皮細胞を培養する際の培養状態判断に適したシステムであると考えられる。

## 6 結論

本論文では、多目的遺伝的プログラミング（多目的 GP）を用い、培養角膜内皮細胞画像から細胞領域を分割するアルゴリズムの提案及び、培養角膜内皮細胞画像から培養状態判断に用いる特徴量を抽出するシステムの提案とその有効性の検証を行った。提案したアルゴリズムは、GP を用いた画像処理フィルタの自動構築手法に基づき、GP に使用する設計変数や評価関数をより細胞画像領域分割に特化した設計である。本アルゴリズムで構築される画像処理フィルタは、既知のフィルタを木構造状に組み合わせたものである。また、GP を用いて木構造の最適化を行う際には、探索の妨げとなる木構造の肥大化を抑えるためにサイズ制限のパラメータを設定する必要がある。しかし、このパラメータが探索の性能と最終的な分割精度に影響してくるため、サイズ制限を用いる必要が無い多目的 GP の適用を行った。

提案手法の有効性を検証するため、10 枚の培養角膜内皮細胞に対して 2 つの実験を行った。実験 1 では、細胞画像の一部の領域である学習データから画像処理フィルタの構築を行い、学習データに基づく領域分割が可能であるかの検証を行った。その際にそれぞれの画像に対して、単目的 GP(従来手法) と多目的 GP を用いた場合の比較を行った。構築結果では、全ての学習データにおいて多目的 GP が単目的 GP と同等以上の分割精度を示した。

実験 2 では、実験 1 で構築した画像処理フィルタをそれぞれの学習データと同一検体である細胞画像に適用し、構築した画像処理フィルタの汎用性能について検証を行った。実験の結果、多目的 GP によって構築した画像処理フィルタが画像解析ソフトウェアである ImageJ に対して、10 枚中 9 枚の画像で高い汎用性を示した。ImageJ よりも低い性能を示した画像においても分割精度の差は約 2% であり、全画像の分割結果を平均すると多目的 GP が ImageJ よりも 10% 程度上回る分割精度を示したことから、同等以上の性能を示したことが確認できた。

また、実験 2 で得られた領域分割結果から培養の指標とされている特徴量の抽出を行った。抽出した特徴量は細胞数、細胞密度、細胞の形状（六角形細胞の割合）である。実験で用いた 10 枚の画像を専門家が良好と判断した画像と不良と判断した画像に分け、各特徴量の平均を比較したところ、状態が良好であれば細胞数及び細胞密度が高い値を、状態が不良であれば低い値を示した。

以上の検証結果より、提案アルゴリズムが既存の画像解析ソフトよりも高精度な細胞画像領域分割を行うことができ、提案システムによって得られた特徴量が培養状態の判断に有用であることが示された。

## 参考文献

- 1) 小泉範子, 西田幸二, 天野史郎, 木下茂. 日本における角膜再生医療の現状. 日本眼科学会雑誌 = Journal of Japanese Ophthalmological Society, Vol. 111, No. 7, pp. 493–503, jul 2007.

- 2) Dr. Michael D. Abramoff, Dr. Paulo J. Magalhaes, and Dr. Sunanda J. Ram. Image processing with imagej. *Biophotonics International*, Vol. 11, No. 7, pp. 36–42, July 2004.
- 3) Anne E Carpenter, Thouis R Jones, Michael R Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A Guertin, Joo Han Chang, Robert A Lindquist, Jason Moffat, Polina Golland, and David M Sabatini. Cellprofiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, Vol. 7, No. 10, 2006.
- 4) John. R. Koza. *Genetic Programming: On the Programming of computers by Means of Natural Selection*. MIT Press, 1992.
- 5) 青木紳也, 長尾智晴. 木構造状画像変換の自動構築法 ACTIT. 映像情報メディア学会誌 : 映像情報メディア, Vol. 53, No. 6, pp. 888–894, jun 1999.
- 6) 中野雄太, 長尾智晴. 3D-ACTIT による 3D-PET 画像からの肝臓領域自動抽出. 映像情報メディア学会誌 : 映像情報メディア, Vol. 62, No. 3, pp. 429–434, mar 2008.
- 7) Tomoyuki Hiroyasu, Sosuke Fujita, Akihito Watanabe, Mitsunori Miki, Maki Ogura, and Manabu Fukumoto. Comparison of gp and sap in the image-processing filter construction using pathology images. In *Image and Signal Processing (CISP), 2010 3rd International Congress on*, Vol. 2, pp. 904–908, oct. 2010.
- 8) 章人渡辺, 知之廣安, 光範三木, 久猛横内. 117 遺伝的プログラミングにおける木の深さと突然変異の与える影響. 最適化シンポジウム講演論文集, Vol. 2008, No. 8, pp. 87–91, nov 2008.
- 9) 井上智之. 角膜内皮細胞の臨床的観察法. あたらしい眼科 = Journal of the eye, Vol. 26, No. 2, pp. 141–146, feb 2009.
- 10) 小泉範子. 霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発. 日本眼科学会雑誌, Vol. 113, No. 11, pp. 1050–1059, nov 2009.
- 11) Ide Takeshi, Nishida Kohji, Yamato Masayuki, Sumide Taizo, Utsumi Mika, Nozaki Takayuki, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo, and Tano Yasuo. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials*, Vol. 27, No. 4, pp. 607–614, 2006.
- 12) 西田幸二. 角膜の再生医療. 東北医学雑誌, Vol. 118, No. 2, pp. 117–122, dec 2006.
- 13) 加藤竜司, 本多裕之. 細胞画像インフォマティクスによる細胞品質評価法. 生物工学会誌 : seibutsu-kogaku kaishi, Vol. 88, No. 12, pp. 646–648, dec 2010.

- 14) 竹本智子, 横田秀夫. 細胞内観察画像における領域分割性能の評価. 理研シンポジウム VCAD システム研究, Vol. 2, No. 3, mar 2010.
- 15) Shinya Aoki and Tomoharu Nagao. Automatic construction of tree-structural image transformations using genetic programming. In *Image Analysis and Processing, 1999. Proceedings. International Conference on*, pp. 136–141, 1999.
- 16) B.Sathya and R.Manavalan. Image segmentation by clustering methods: Performance analysis. *International Journal of Computer Applications*, Vol. 29, No. 11, pp. 27–32, sep 2011. Published by Foundation of Computer Science, New York, USA.
- 17) David E. Goldberg. *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., Boston, MA, USA, 1st edition, 1989.
- 18) Sean Luke and Liviu Panait. A comparison of bloat control methods for genetic programming. *Evol. Comput.*, Vol. 14, No. 3, pp. 309–344, September 2006.
- 19) 坂和正敏. 離散システムの最適化. 森北出版, 2000.
- 20) Kalyanmoy Deb, Amrit Pratap, Sameer Agarwal, and T. Meyarivan. A fast elitist multi-objective genetic algorithm: Nsga-ii. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, Vol. 6, pp. 182–197, 2000.
- 21) L. Vincent and P. Soille. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, Vol. 13, No. 6, pp. 583–598, jun 1991.
- 22) Jose Alfredo F. Costa and Jackson G. de Souza. Image segmentation through clustering based on natural computing techniques. *Image Segmentation*, pp. 57–82, 2011.
- 23) Xuqing Wu and Shishir K. Shah. A bottom-up and top-down model for cell segmentation using multispectral data. In *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2010 IEEE International Symposium on*, pp. 592–595, april 2010.
- 24) Milan Sonka, Vaclav Hlavac, and Roger Boyle. *Image processing, analysis, and machine vision*. International Thomson Computer Press, 1996.
- 25) Naoki Okumura, Morio Ueno, Noriko Koizumi, Yuji Sakamoto, Kana Hirata, Junji Hamuro, and Shigeru Kinoshita. Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a rock inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Vol. 50, No. 8, pp. 3680–3687, 2009.
- 26) Ferreira Tiago and Wayne Rasband. ImageJ User Guide IJ 1.45m. <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>.

- 27) Francesc Tinena, Pilar Sobrevilla, and Eduard Montseny. On quality assessment of corneal endothelium and its possibility to be used for surgical corneal transplantation. In *FUZZ-IEEE*, pp. 1326–1331. IEEE, 2009.

## 付 図

1	木構造状フィルタ . . . . .	1
2	遺伝的アルゴリズム及び遺伝的プログラミングにおける遺伝子型 . . . . .	1
3	交差・突然変異 . . . . .	2
4	2目的最小化問題におけるパレート最適解 . . . . .	2
5	NSGA-IIの母集団更新方法 . . . . .	3
6	非優越ソートを用いたランク付け . . . . .	3
7	混雑距離の計算 . . . . .	4
8	培養角膜内皮細胞画像からの特徴量抽出システムの概要図 . . . . .	4
9	システムで用いる学習画像 . . . . .	4
10	watershed アルゴリズムの概略図 . . . . .	5
11	shaped watershed アルゴリズムの処理結果 . . . . .	5
12	六角形抽出の流れ . . . . .	5
13	本実験で対象とする培養角膜内皮細胞画像 . . . . .	6
14	各対象画像に対する学習データセット . . . . .	7
15	多目的 GP で得られた木構造状フィルタの一例 . . . . .	8
16	GP, 多目的 GP によって得られた学習データの領域分割結果 . . . . .	9
17	各学習画像における領域分割精度の比較 . . . . .	9
18	全学習画像における木のサイズ毎の領域分割精度の平均の比較 . . . . .	10
19	単目的 GP で構築した画像処理フィルタの各細胞画像への適用結果 . . . . .	11
20	多目的 GP で構築した画像処理フィルタの各細胞画像への適用結果 . . . . .	12
21	ImageJ による各細胞画像の領域分割結果 . . . . .	13
22	各細胞画像における領域分割精度の比較 . . . . .	14
23	全細胞画像における木のサイズ毎の領域分割精度の平均の比較 . . . . .	14
24	Im8 における領域分割が困難な領域 . . . . .	14

## 付 表

1	設計変数として使用する画像処理フィルタ . . . . .	15
2	NSGA-II 及び GP で用いたパラメータ . . . . .	15
3	各細胞画像の特徴量抽出結果 . . . . .	16
4	培養状態毎の特徴量比較 . . . . .	16

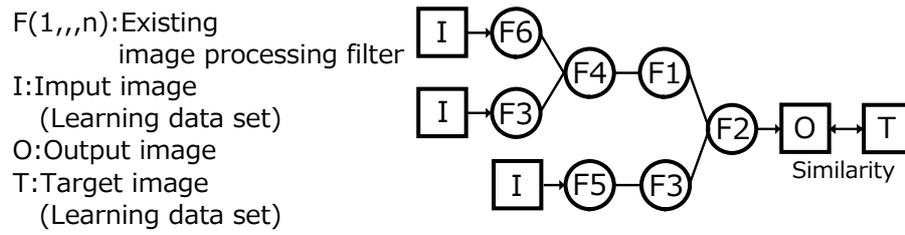


Fig. 1 木構造状フィルタ

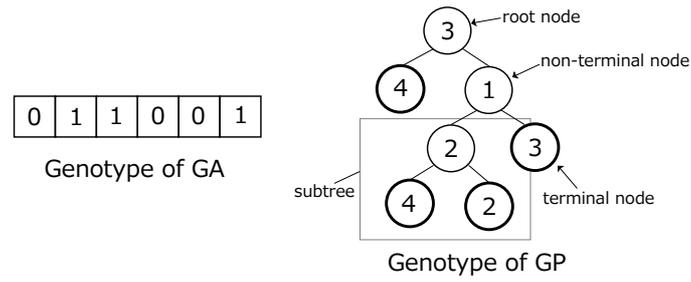


Fig. 2 遺伝的アルゴリズム及び遺伝的プログラミングにおける遺伝子型

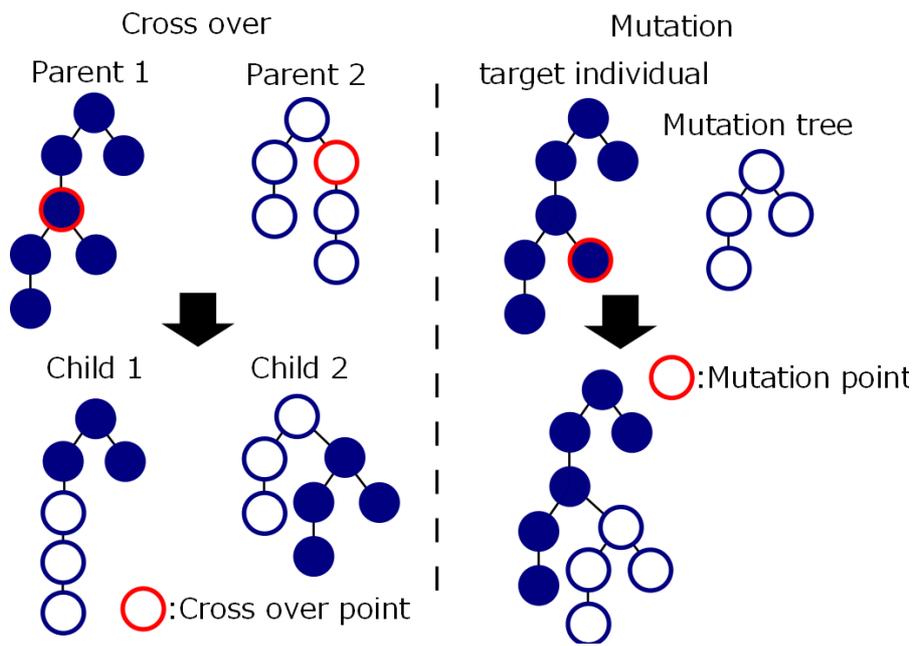


Fig. 3 交差・突然変異

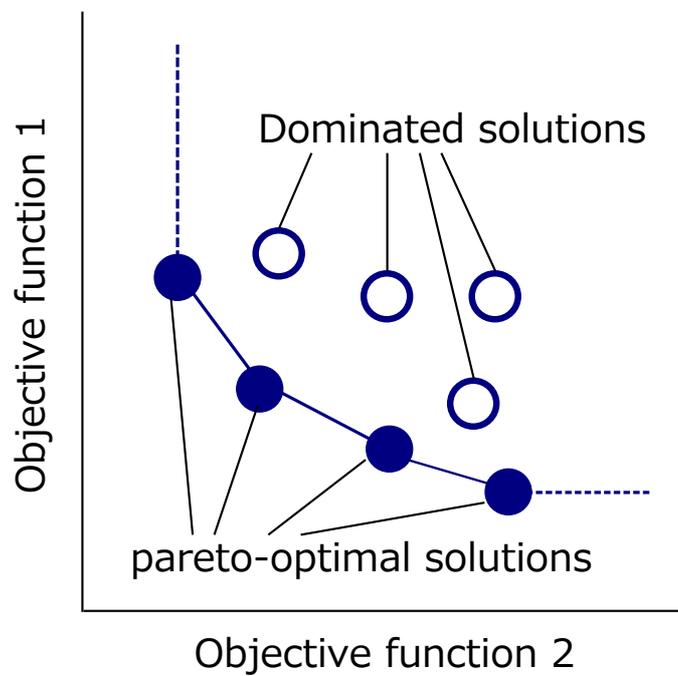


Fig. 4 2目的最小化問題におけるパレート最適解

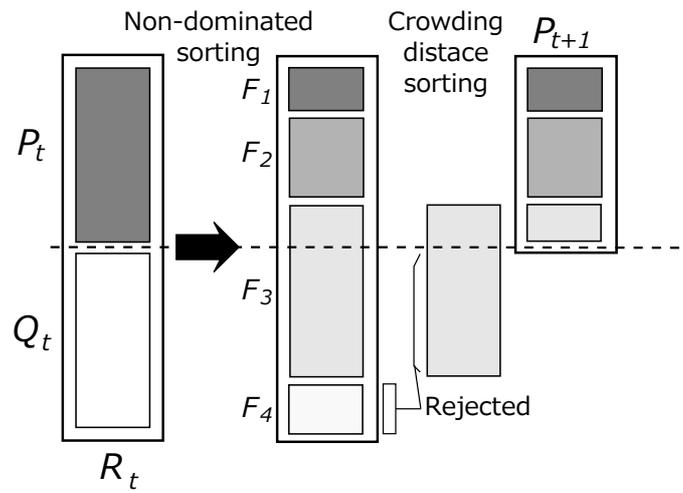


Fig. 5 NSGA-II の母集団更新方法

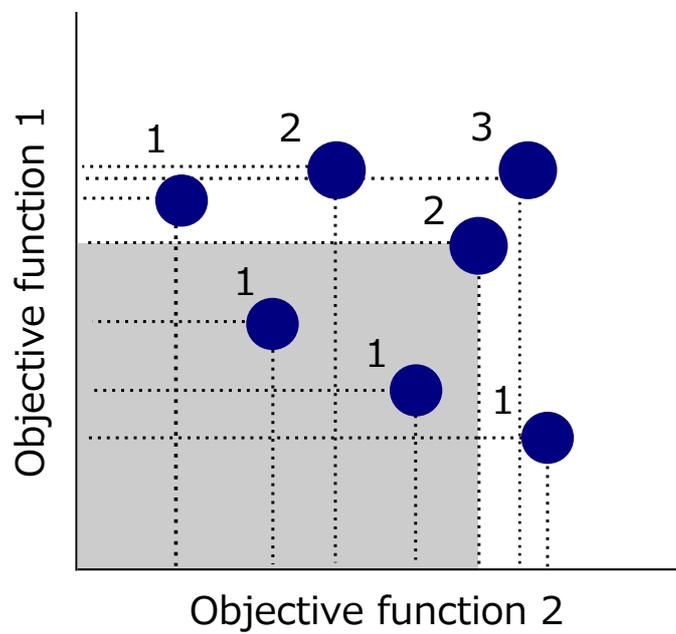


Fig. 6 非優越ソートを用いたランク付け

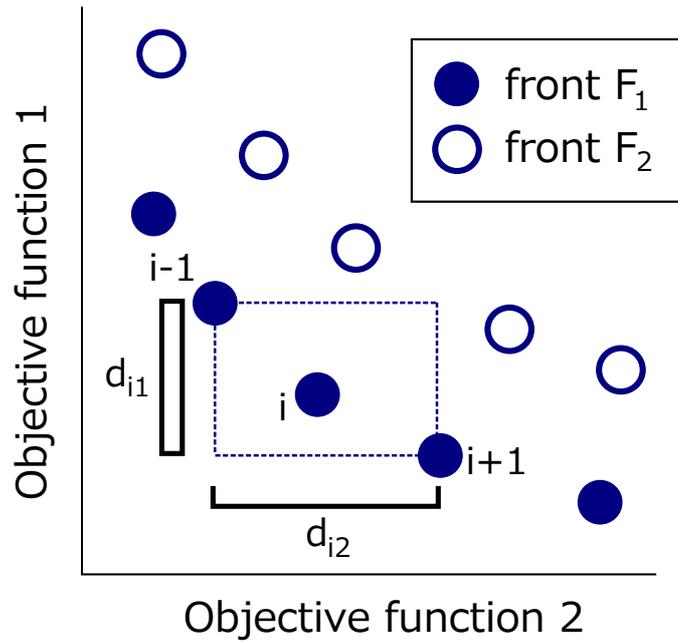


Fig. 7 混雑距離の計算

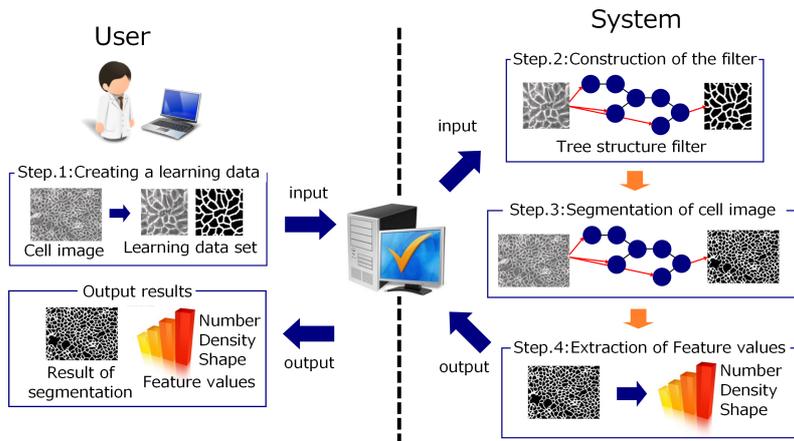


Fig. 8 培養角膜内皮細胞画像からの特徴量抽出システムの概要図

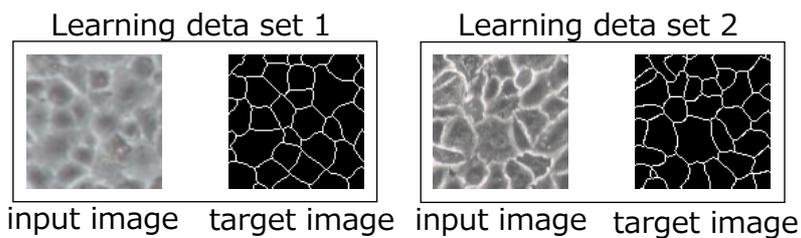


Fig. 9 システムで用いる学習画像

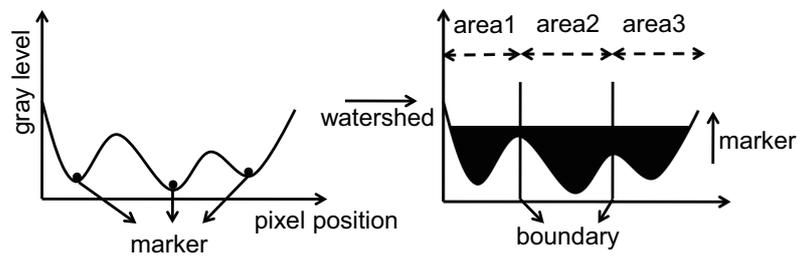


Fig. 10 watershed アルゴリズムの概略図

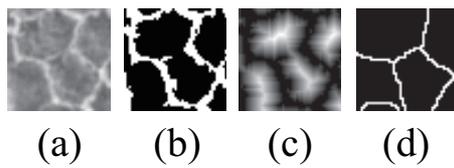


Fig. 11 shaped watershed アルゴリズムの処理結果

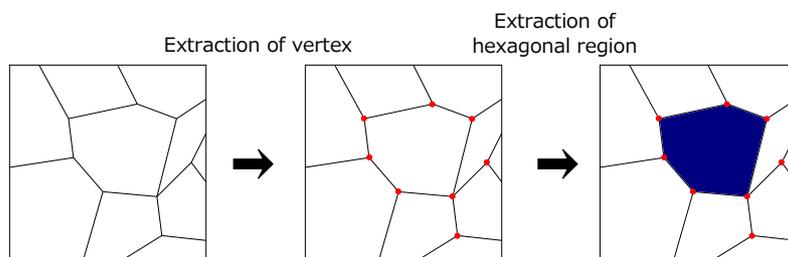


Fig. 12 六角形抽出の流れ

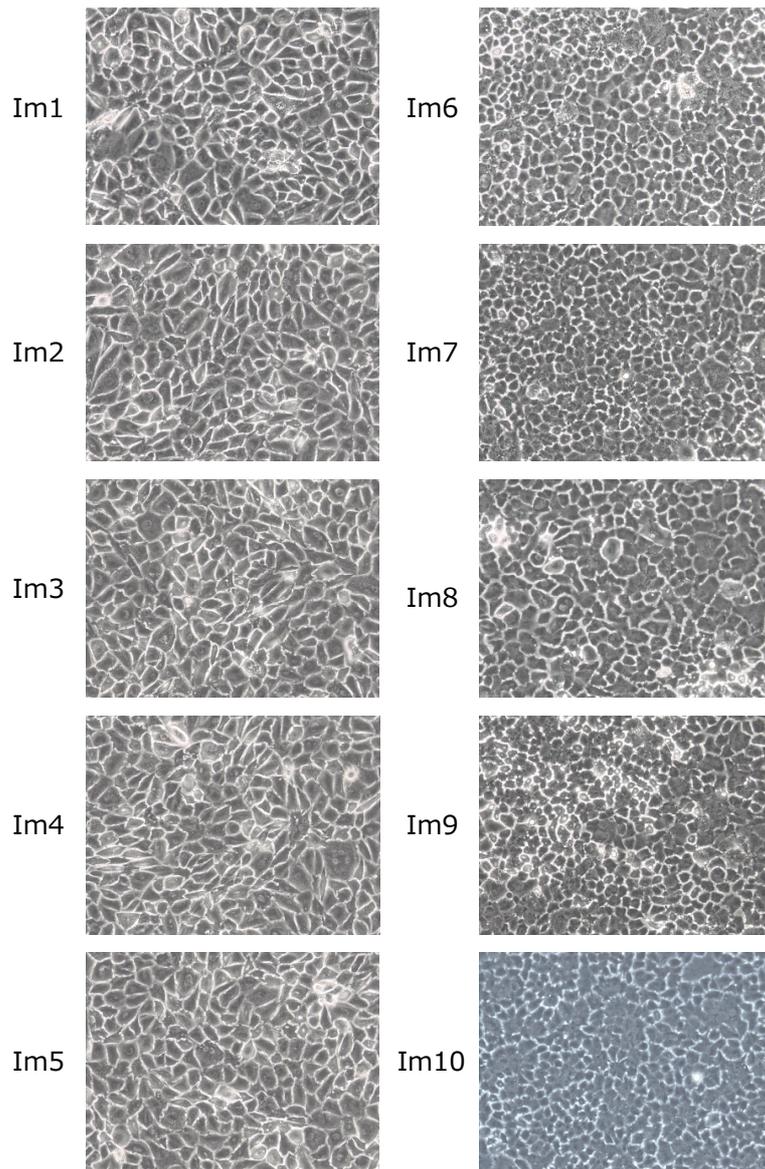


Fig. 13 本実験で対象とする培養角膜内皮細胞画像

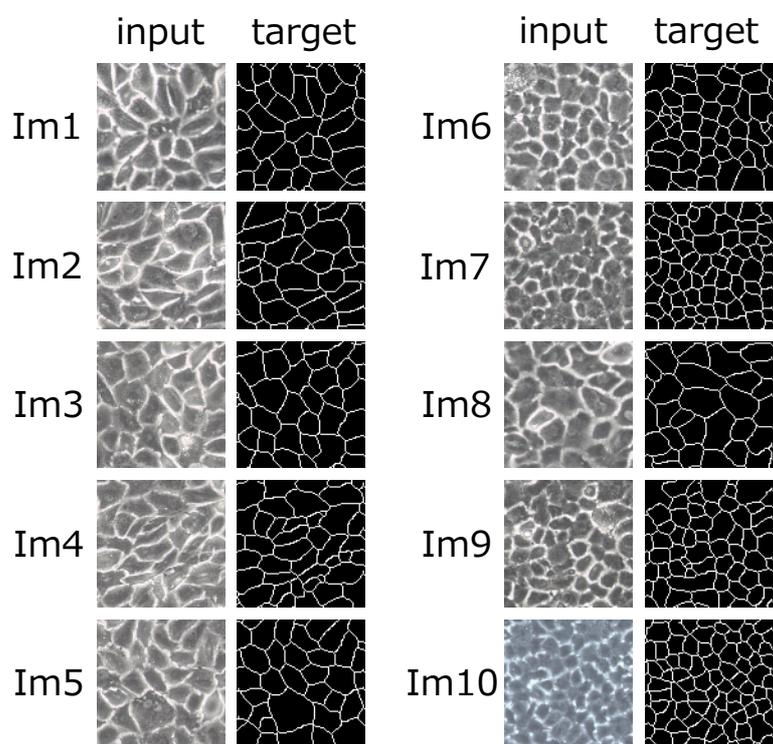


Fig. 14 各対象画像に対する学習データセット

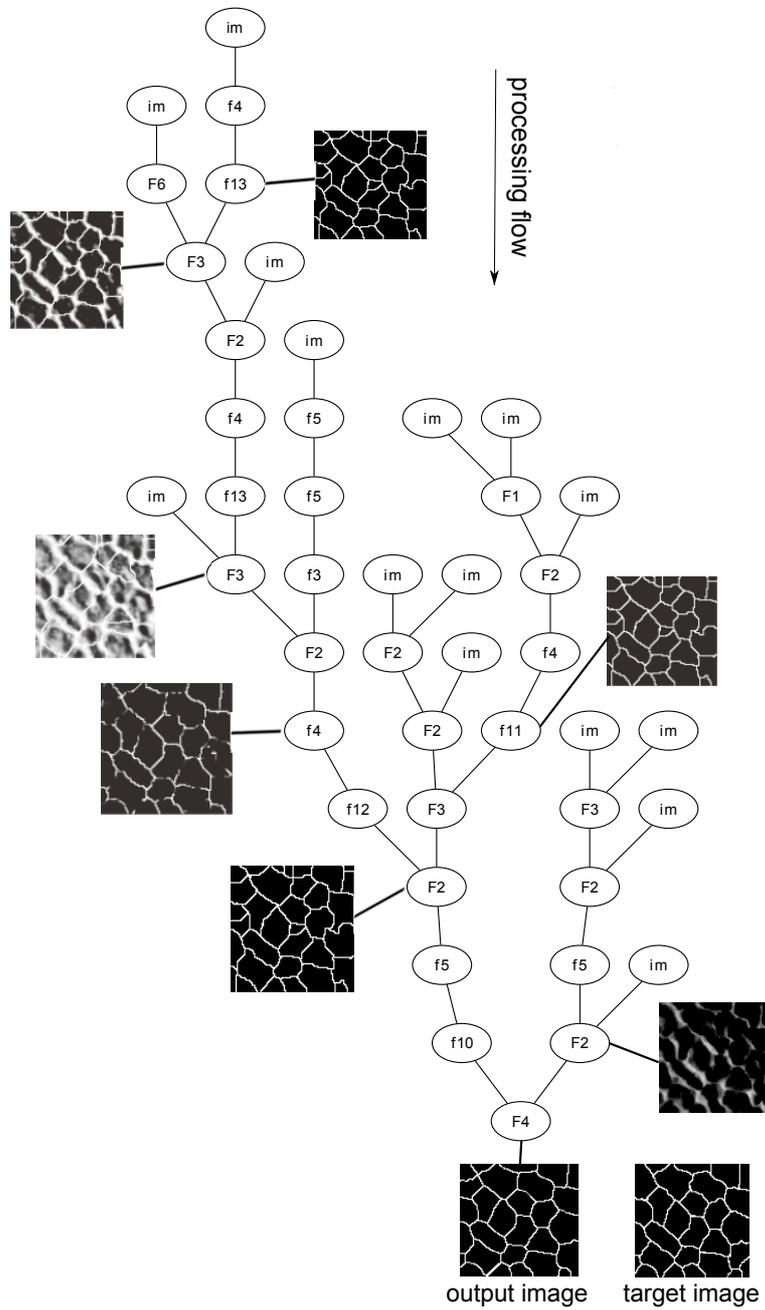


Fig. 15 多目的 GP で得られた木構造状フィルタの一例

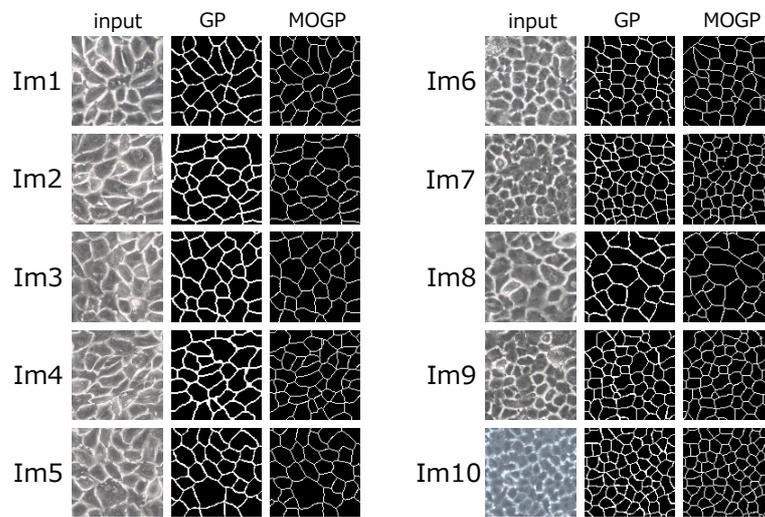


Fig. 16 GP, 多目的 GP によって得られた学習データの領域分割結果

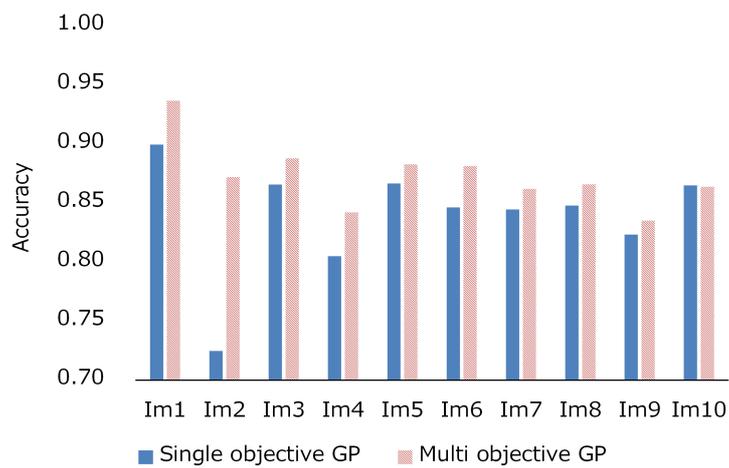


Fig. 17 各学習画像における領域分割精度の比較

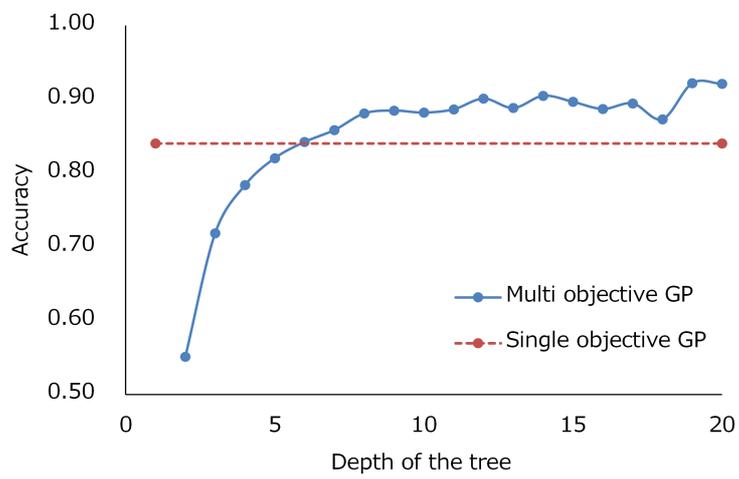


Fig. 18 全学習画像における木のサイズ毎の領域分割精度の平均の比較

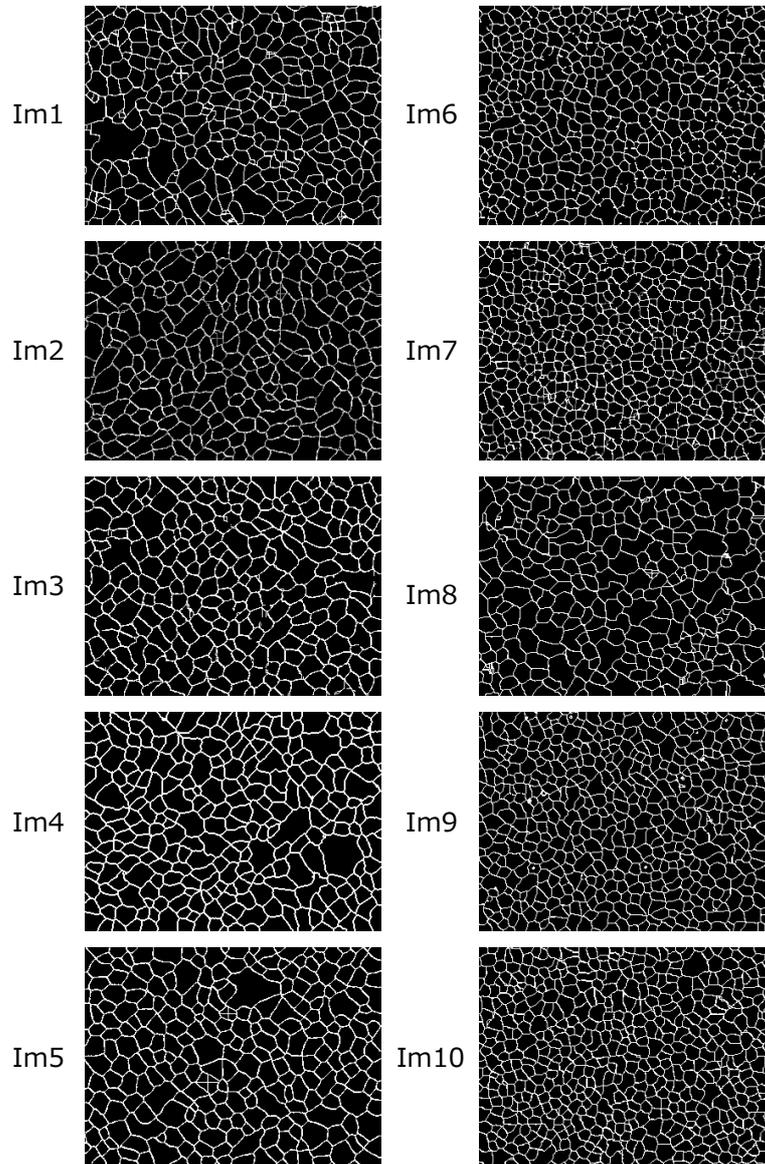


Fig. 19 単目的 GP で構築した画像処理フィルタの各細胞画像への適用結果

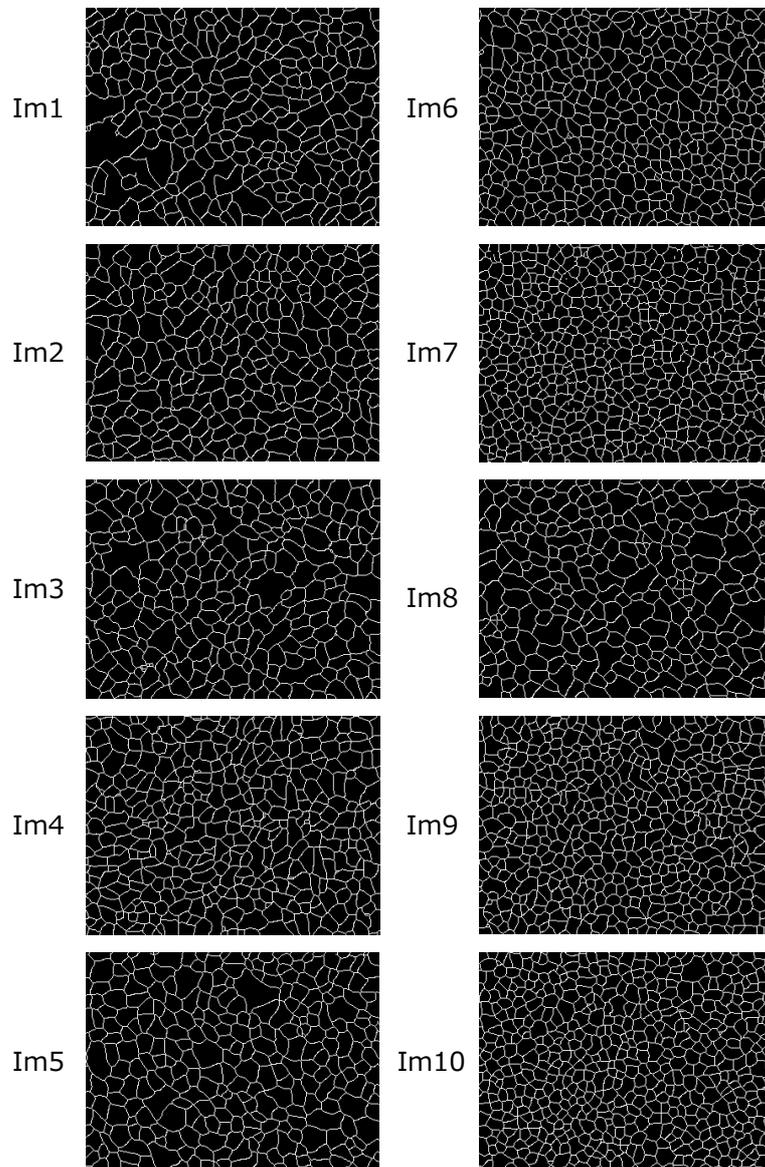


Fig. 20 多目的 GP で構築した画像処理フィルタの各細胞画像への適用結果

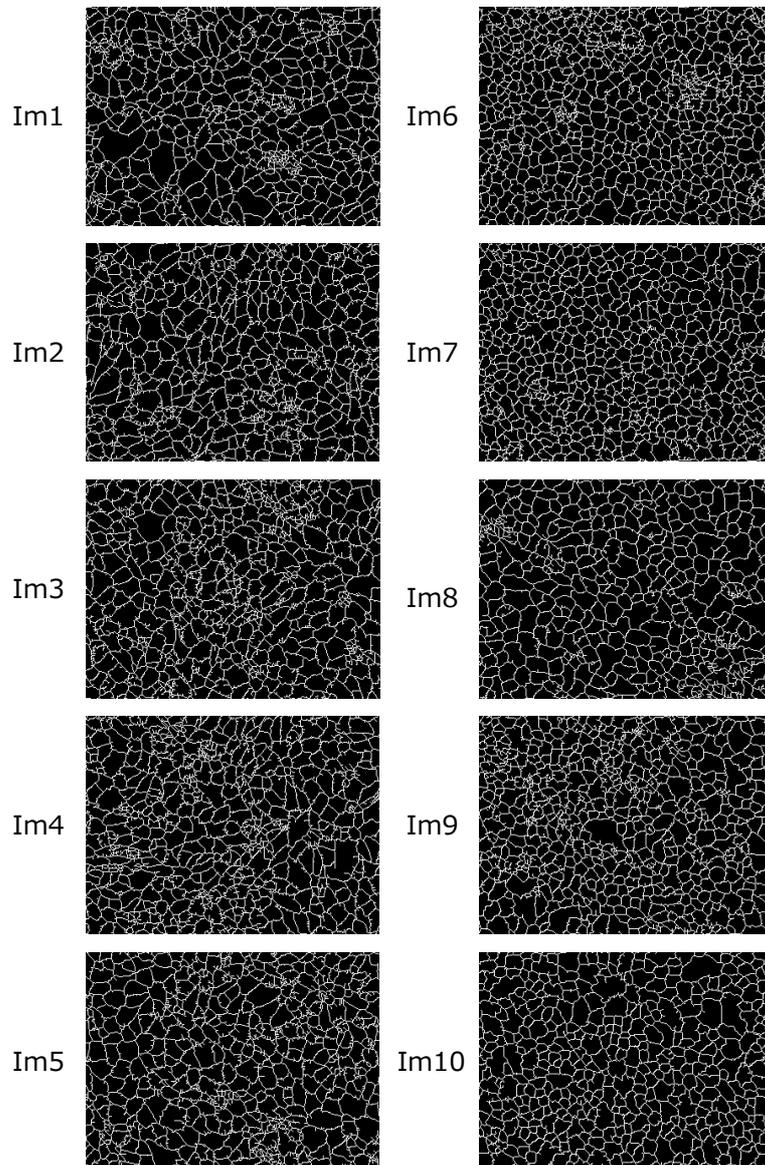


Fig. 21 ImageJによる各細胞画像の領域分割結果

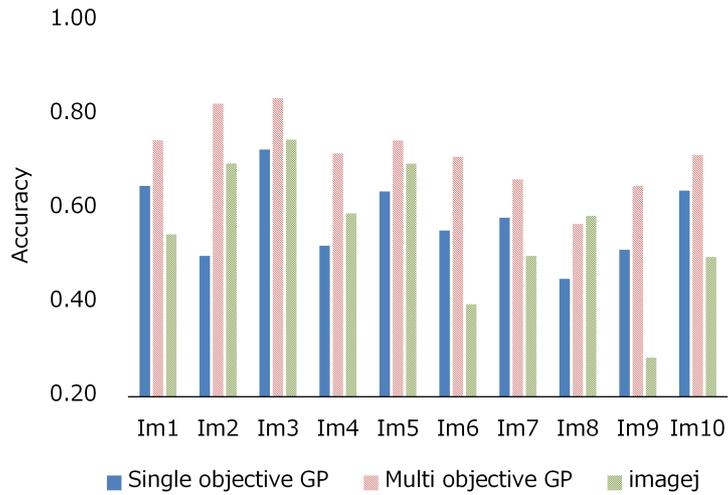


Fig. 22 各細胞画像における領域分割精度の比較

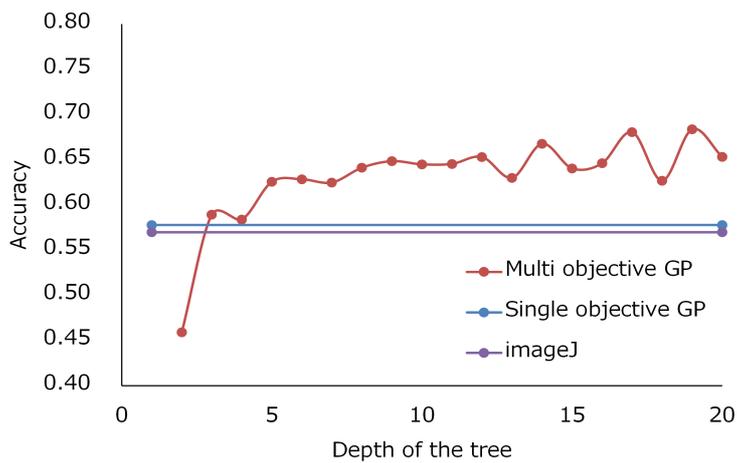


Fig. 23 全細胞画像における木のサイズ毎の領域分割精度の平均の比較

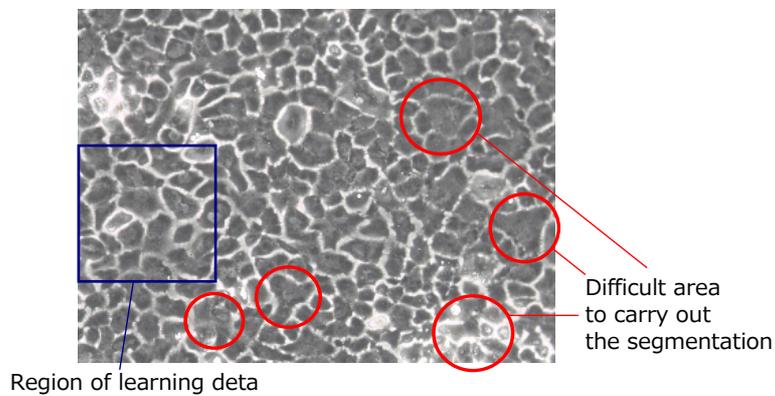


Fig. 24 Im8 における領域分割が困難な領域

Table 1 設計変数として使用する画像処理フィルタ

number	フィルタ名
f1	最小値
f2	最大値
f3	収縮
f4	膨張
f5	ガウシアン
f6	二値化 (大津)
f7	二値化 (平均)
f8	中央値
f9	Watershed
f10	Watershed (二値)
f11	shape based watershed
f12	shape based watershed (二値)
f13	距離画像変換
F1	論理和
F2	論理積
F3	代数積
F4	代数和

Table 2 NSGA-II 及び GP で用いたパラメータ

パラメータ	値
個体数	200
世代数	500
交叉率	1.0
突然変異率	0.1
選択方法	トーナメント
トーナメント数	2
木の深さ制限	20
ペナルティ	$10^{-3}$
試行回数	10

Table 3 各細胞画像の特徴量抽出結果

特徴量	im1	im2	im3	im4	im5	im6	im7	im8	im9	im10
細胞数 [個]	291	291	298	431	309	435	542	290	553	596
細胞密度 [ $mm^2$ ]	1742	1742	1790	2588	1856	2613	3256	1741	3322	3580
六角形細胞率 [%]	25.3	26.9	26.8	22.8	26.5	22.6	27.7	24.1	23.0	25.8

Table 4 培養状態毎の特徴量比較

特徴量	不良	良好
細胞数 [個]	324	483
細胞密度 [ $mm^2$ ]	1944	2902
六角形細胞率 [%]	25.6	24.6