

カイコガの単一神経細胞の三次元形状抽出

Extraction of a single neuron form in the brain of silkworm moth

| | | | |
|---|--|--|--|
| 中島 佳奈子 Kanako Nakajim 埼玉大学 Saitama Univ. | 森下 壮一郎 Soichiro Morishita 東京大学 The Univ. of Tokyo | 加沢 知毅 Tomoki Kazawa 東京大学 The Univ. of Tokyo | 大武 美保子 Mihoko Otake 東京大学 The Univ. of Tokyo |
| 神崎 亮平 Ryohei Kanzaki 東京大学 The Univ. of Tokyo | 浅間 一 Hajime Asama 東京大学 The Univ. of Tokyo | 三島 健稔 Taketoshi Mishima 埼玉大学 Saitama Univ. | |

Abstract: In this paper, we propose a method for automatic extraction of a single neuron form from Confocal Laser Scanning Microscopic images. Because of several noises, deficiency parts appear in the binary images through binarization process. To compensate those deficiency parts, we pick several points from the image series, and interpolate those points with smooth curves. It enables to reduce the burden of manual extraction processes. we extracted one of parts of a pre motor neuron form.

1 はじめに

昆虫の脳は $10^5 \sim 10^6$ 個程度の神経細胞で構成されている。これは人間の脳が $10^{10} \sim 10^{11}$ 個程度であるのに比べ遥かに少ない。それにも関わらず昆虫は十分に複雑な行動や記憶、学習する能力を持ち、周囲の環境変化に適応して行動できる [1]。すなわち、昆虫は必要最低限の記憶容量において環境変化や刺激などの入力に対し処理を行い、入力に対する複雑な行動は複数の基本的な挙動プログラムの修飾や切替えによると考えられる。このことより現在、昆虫の挙動は計算機やロボット工学などの発展への応用が期待され、昆虫の脳の構造や情報伝達のメカニズムを解明するための研究が進められている [2][3]。また、昆虫の中でもカイコガは計測や解析が比較的容易である上にフェロモン刺激によって明確な定型的行動を示すことが分かっている [3]。このため、カイコガは刺激から行動に至る一連の情報処理を理解するためのモデル動物としての役割が期待されている。

カイコガの行動や機能は、特定の単一神経細胞で制御されることが多い。中でも、pre motor neuron は行動の核となる神経細胞であり、他の昆虫と形状やネットワークに共通性があると考えられている。従って、pre motor neuron の構造を明らかにすることで、他の昆虫の神経ネットワークや行動パターンが推定可能になると期待できる。また、三次元形状のモデル構築により神経細胞の構造解明だけでなく、刺激による電位変化のシミュレーションなども可能になる [4]。それらのためにはまず個々の神経細胞の形状を決定することが求

められる。

単一神経細胞の三次元形状の決定は、蛍光染色した単一神経細胞の断層画像を共焦点レーザ顕微鏡 (CLSM: Confocal Laser Scanning Microscope) で取得し、二値化処理を施すことにより行われる。しかし、CLSM で取得した画像には自家蛍光などのノイズが含まれているので、二値化処理により多くの箇所が欠損する。これに対し、現在は人間が目測で欠損箇所を判断し、手作業で補正している。そのため、① 抽出者の負担が大きく大量のデータの処理が困難、② 抽出者の主観の混入などの問題がある。

本稿では、二値化によって生じた形状の欠損を自動的に補正する手法を提案する。

2 単一神経細胞の三次元形状の抽出

2.1 単一神経細胞の断層画像取得

図1にカイコガの脳の顕微鏡写真を示す。このような試料からの単一神経細胞の断層画像の取得は次の手順で行う [2]。

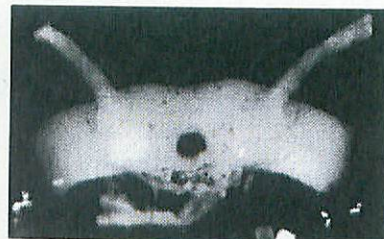


図1: カイコガの脳

- (i) 蛍光染色したい任意の単一神経細胞に蛍光色素を含んだガラス管電極を刺入し、微弱電流を流して蛍光染色する (図 2)
- (ii) S/N 比の大きい画像を得るために、脳をホルムアルデヒドで固定した後、エタノールで脱水し、サリチル酸塩で透徹する
- (iii) CLSM より、中心軸のずれない高精度な断層画像を取得する

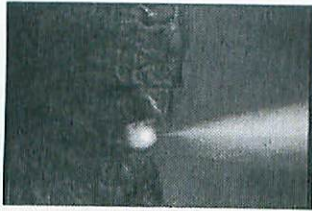


図 2: 単一神経細胞の蛍光染色

図 3 に CLSM より取得した pre motor neuron の断層画像を二次元に投影したものを示す。

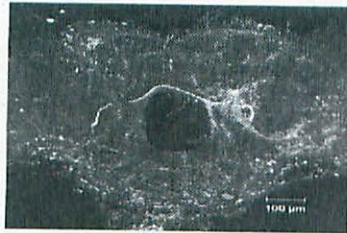


図 3: CLSM による pre motor neuron

2.2 三次元形状の抽出における問題

CLSM より取得した断層画像から蛍光染色された領域のみを抽出することで、単一神経細胞の三次元形状は得られる。しかし CLSM で取得した画像は、断層の深さの違いによる明度の差や光学的なノイズ、組織の自家蛍光などの影響を受けていることが多い。特に、組織の自家蛍光は生物には必ず存在し、データを取得する上で避けることはできない。また、自家蛍光が強い部分では、染色した神経細胞が自家蛍光に埋もれてしまう場合があるので、神経細胞の形状のみを抽出することは困難である。

二値化処理の閾値を高めを設定することによりこれらのノイズは除去可能である。しかし、同等染色状態が均一ではないために自家蛍光が強い断層では図 4 のように必要な神経細胞の部分まで除去され、形状に欠

損が生じてしまう。

そこで現在は、二値化処理の閾値設定を断層毎に人間が目測で行い、さらに二値化処理による欠損箇所の補正も手作業で行っている。

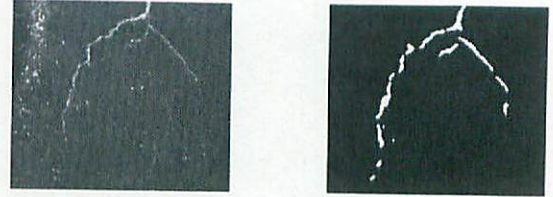


図 4: 二値化処理による形状の欠損発生

これまでにも、神経細胞の三次元形状を抽出する研究が行われてきたが、自家蛍光等のノイズを含まない画像に対しての研究がほとんどである [5]。また、明度の差などによる形状の欠損箇所を補正する研究も行われているが、未だ手作業に頼る部分が多い [6]。いずれにせよこれらの研究は、神経のトポロジカルな特徴を抽出するものであり、神経の太さまでは考慮されていない。活動電位の発生する部位や活動電位の伝達速度は神経の太さに依存するので [7]、構造の解析には神経の太さも重要な情報である。

本稿では、二値化によって欠損した箇所を自動的に補正して太さを含めた形状を抽出する手法を提案する。

3 提案手法

図 5 に提案手法の概略を示す。以降、簡単のために二次元の図で表すが、実際の処理は三次元的に行う。

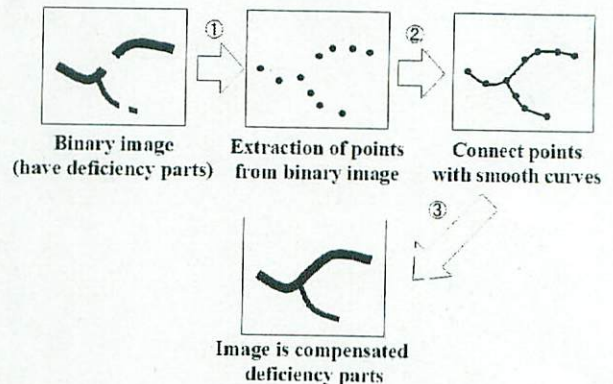


図 5: 提案手法の概略図

まず、二値化処理を施してノイズを除去した画像について、二値化による欠損の有無に関わらず、ほぼ同等な点の集合を得るために、背景以外の画素からいくつかの点を離散的に選出する。次に、選択した点を滑

らかな曲線で補間する。曲線の太さも同様に曲線上で補間する。次節で各手順について詳しく述べる。

3.1 ユークリッド距離変換画像からのスケルトン抽出

本節では、二値画像から離散的に点を選出する手続きを述べる。

まず、二値画像にユークリッド距離変換を施す。ユークリッド距離変換とは、二値画像の各画素値を背景画素からの最短ユークリッド距離に変換する処理である。図6に一例を示す。

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|---|---|---|------------|------------|------------|------------|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 1 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 |
| 1 | $\sqrt{2}$ | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | $\sqrt{2}$ | 1 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |

図6: ユークリッド距離変換画像

次に距離画像からスケルトンを抽出する。スケルトンとは、ユークリッド距離変換画像上の各点に、その点を中心として点上の画素値、すなわち背景画素からの距離値を直径とした円を置いていくとき、他の円に覆われることのない点を少なくとも1つ含むような円の中心点のことである [8]。図7にスケルトン抽出の例を示す。スケルトンには距離値が与えられれば、原画像を完全に復元できるという特徴がある [8]。また、このとき距離値はその点を中心にした内接円の直径である。このことから、本稿ではスケルトンの距離値を神経の太さとみなす。図6の画像からスケルトン抽出を行った結果を図8に示す。

| | | | | |
|---|---|------------|------------|---|
| 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 |
| 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 |
| 0 | 0 | 1 | 2 | 2 |

Skeleton

図7: スケルトン抽出

そして、スケルトンの中から離散的に点を選出する。スケルトンの端点を開始点とし、選出された点から一定距離以上離れている点をスケルトンの中から逐次的

に選出していく。

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|---|---|---|------------|------------|------------|------------|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 1 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 | 0 |
| 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | $\sqrt{2}$ | $\sqrt{2}$ | 1 | 0 |
| 1 | $\sqrt{2}$ | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | $\sqrt{2}$ | 1 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |

図8: 図6に対するスケルトン抽出

3.2 Bezier 曲線による点の補間

本節では、スケルトンから選出した離散的な点を複数の曲線で補間する手順を述べる。

まず、図9のように一つの曲線で接続される候補点在同一のグループに属するようにグループ分けする。

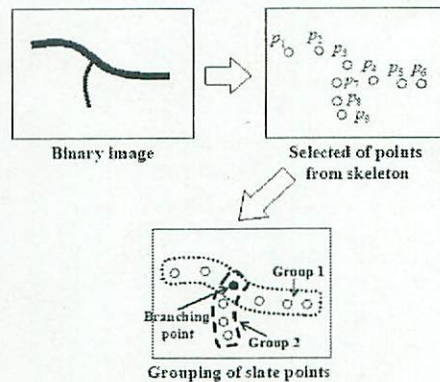


図9: 候補点の選択

同一のグループに属する点は互いに近接しており、また図10で示すように、端点を除く任意の点とそれに隣接する点とでなす角 θ は π に近いと考えられる。このことから、グループ分けの指標として二点間の距離と三点からなる角度を採用する。角度を評価する式を式(2)で表す。なお、十分に距離が離れている点在同一のグループに属することはないと考えられるので、距離が閾値 d より大きいときは評価の対象としない。距離が最小であり、式(2)が閾値より大きい点を同一のグループとする。ここで n はスケルトンから選出した点の総数であり、 $i \neq j$ かつ $j \neq k$ かつ $k \neq i$ とする。

$$f(i, j, k) = -\cos(\angle p_i p_j p_k) = -\frac{(\vec{p_j p_i} \cdot \vec{p_j p_k})}{|\vec{p_j p_i}| |\vec{p_j p_k}|} \quad (1)$$

$(i, j, k = 1, \dots, n)$



図 10: 三点からなる角度

グループ分けと補間は逐次的に行う。すなわち、一つのグループについてそれに属するすべての候補点を選択した時点でそれらを曲線で補間する。次に、グループが未知な点に対して同様の手順でグループ分けを行うが、このときに既に補間された曲線の周囲にある点はその点に比べ相対的にそれがノイズだったときの影響が大きくなってしまふ。従って、あらかじめ候補点の選択対象から除外することで頑健なグループ分けを行えると考えられる。また、ユークリッド距離に基づいた細線化より得た分岐点を近傍のスケルトンで置換し、それを分岐点とする。

候補点の補間には Bezier 曲線を用いる。Bezier 曲線は、式 (2), (3) より定義される。

$$R(t) = \sum_{i=1}^{n-1} p_i B_i^n(t) \quad (2)$$

$$B_i^n(t) = \binom{n}{i} t^i (1-t)^{n-i}, \quad t = [0, 1] \quad (3)$$

本手法は、離散的な点をスケルトンから選択しているので、選択された点は必ずしも中心線上の点とは限らない。神経細胞のように凹凸が多い場合は、それが顕著である。このことから、開始点と終了点のみを通り、ある程度制御点の影響を受けて補間する Bezier 曲線を用いる。

3.3 補正画像の作成

前節で述べた手続きにより、欠損箇所が補間されるが、このままでは神経細胞の芯線を抽出したにすぎない。本節では、曲線の太さを決定する手続きを述べる。

Bezier 曲線の制御点に用いられている点はスケルトンから選出されたものであるため、必ず距離値が与えられている。しかし、曲線上の他の点はその限りではない。以上のことから、開始点と終了点をもつ距離値とそれ以外の制御点の周囲にあるスケルトンをもつ距離値の平均値を用いて曲線上の距離値を補間する。図 11 に一例を示す。点 p_1, p_4 は開始点と終了点であるの

で距離値 d_1, d_4 をもつ。一方他の制御点は多数のスケルトンの中から選択した点であるため、点 p_2, p_3 の周囲には他のスケルトンが存在する。点 p_2, p_3 のそれぞれの周囲に存在するスケルトンをもつ距離値の平均値を最短距離にある曲線上の点 p_2', p_3' の距離値 d_2, d_3 とする。そして、この 4 点の距離値を制御点として式 (2), (3) より距離値を滑らかに補間する。

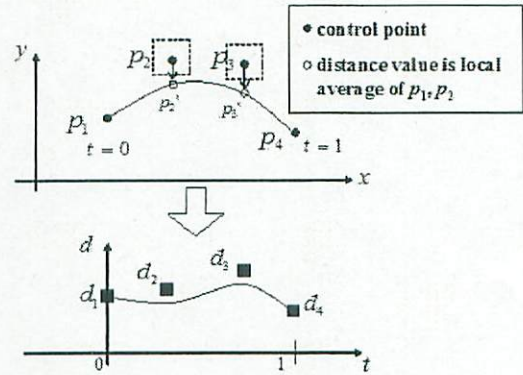


図 11: 距離値補間

以上の手法を用いて、二値化処理により生じた欠損箇所を自動的に補正し、単一神経細胞の三次元形状を得る。

4 実験

提案手法を用いて pre motor neuron の形状抽出実験を行った。本実験で示す二値画像は RV-Editor[9] によって三次元的に可視化される。

図 12 は図 3 で示した画像の一部分を拡大したものである。これより、自家蛍光が強く現れていることがわかる。また、図 13 は図 12 に対して人が断層毎に二値化処理の閾値を設定した結果であり、ノイズは除去されているが、多くの箇所形状に欠損が生じているのがわかる。これに対し、提案手法を用いて欠損箇所を補正して神経細胞の形状抽出を行った。

図 13 に対してユークリッド距離変換を行い、抽出したスケルトンから離散的に点を選出した結果を図 14 に示し、その分岐点を図 15 に示す。この点は一定の距離毎に選出した。実験で用いたパラメータ設定を表 1 に示す。これらのパラメータは経験的に設定した。

図 14 の点を Bezier 曲線で補間した結果を図 16 に示す。本実験で用いた画像には分岐点が 7 個存在するので、8 回の補間が行われた。図 16(h) に対して距離値を補間し、補正画像を得た結果を図 17 に示す。

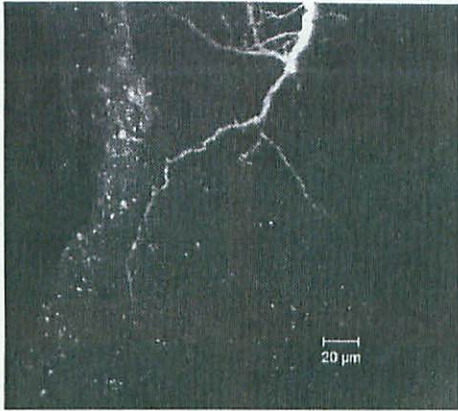


図 12: CLSM で取得した pre motor neuron の一部

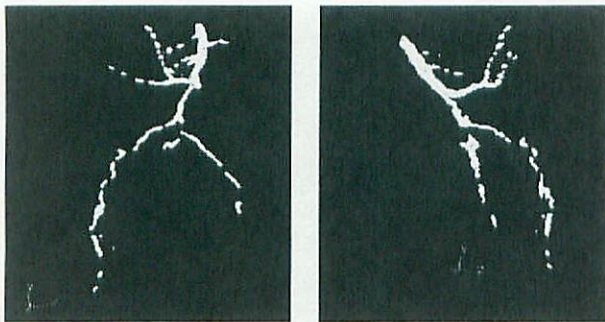


図 13: 二値画像

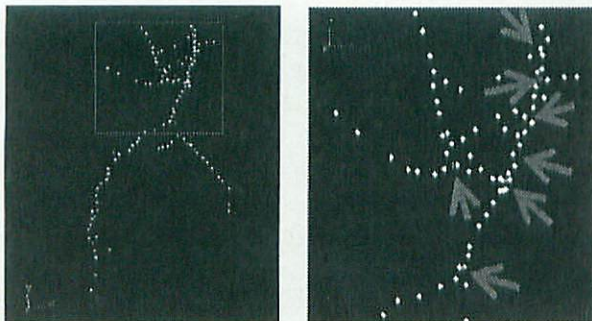


図 14: 離散的な点の選出

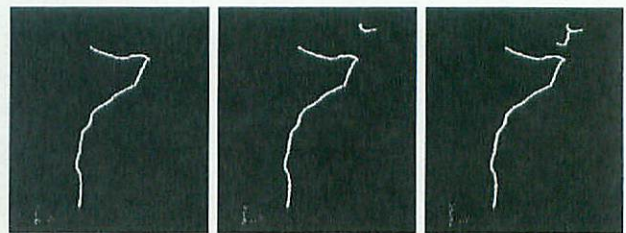
図 15: 分岐点

図 17 より、欠損箇所が補正され、神経細胞の形状をある程度抽出できていることがわかる。これより、提案手法が二値化処理による形状の欠損箇所の補正において有効であることが示された。今後は、これを定量的に評価する必要がある。

本手法では、滑らかな曲線になるように候補点をグループ分けするために距離と角度を指標としているが、距離が近い点を優先にグループ分けを行っているため、先に選択された点の影響を大きく受けてしまう。図 16(a) のように極端に曲がっているのもこのためで

表 1: パラメータ設定

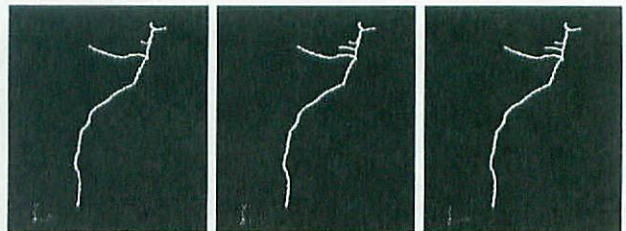
| | |
|---|---|
| image resolution | 1.0 μ m \times 1.0 μ m \times 1.0 μ m |
| image size | $x = 237, y = 403, z = 103$ |
| distance of minimum each slate points | $\sqrt{20}$ |
| number of control points of Bezier curve | 5 |
| step size of t | 0.0001 |
| threshold of $f(i, j, k)$ | 0.39 |
| threshold of d in section 3.2 | $5\sqrt{10}$ |
| threshold of distance removed points around one curve | $\sqrt{20}$ |



(a) 1回目

(b) 2回目

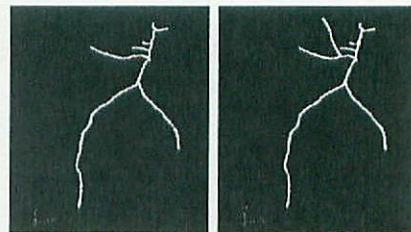
(c) 3回目



(d) 4回目

(e) 5回目

(f) 6回目



(g) 7回目

(h) 8回目

図 16: Bezier 曲線での補間結果

あると考えられ、三点のみに注目したときは角度が小さいが、全体的にみると大きな角度をなしてしまっている。これは、分岐点付近で起こり易いと考えられる。そこで、分岐点を含む局所領域内において補間可能な

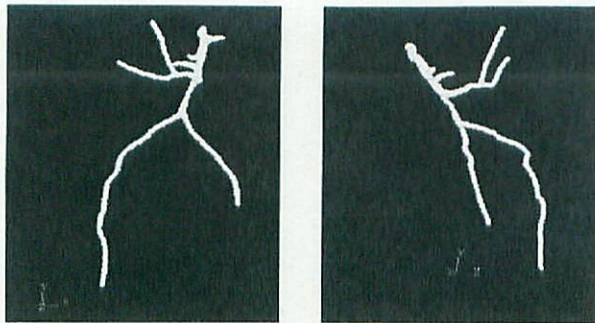


図 17: 補正画像

組合せを複数考え、それらの妥当性を評価することで、これを回避する。評価の指標としては、点の空間的な配置関係や数などを用いることを考える。これにより、パラメータに対しても頑健になると期待できる。また、本手法は分岐部分が欠損していないことを前提としているので、今後はそのような場合の処理も検討する必要がある。

5 おわりに

本稿では、単一神経細胞の三次元形状を決定する際に生じる形状の欠損箇所を自動的に補正する手法を提案した。単一神経細胞のみを蛍光染色してCLSMにより取得した断層画像は、組織の自家蛍光や断層の深さの違いによる明度の差などのノイズを多く含む。そのため、それらの画像にノイズを含まないように抽出処理を施すと、必要な箇所の欠損が避けられない。この問題を解決するために、画像を離散的な点の集合で表現し、それらの点を滑らかな曲線で補間することで欠損箇所を補正する手法を提案した。本手法を実データに適用する実験を行った結果、欠損箇所を滑らかに補正して神経細胞の形状を抽出することができ、提案手法の有効性を示すことができた。

今後は、補間に用いる点のグループ分けについての検討と、曲線同士の接続方法について検討する。また、提案手法による補正結果の定量的な評価を行うために、手作業による補正結果との比較を行う。

参考文献

- [1] 外池光雄, 渋谷達明, “においと脳・行動”, フレグランスジャーナル社, 2003.
- [2] Y. Seki, H. Aonuma and R. Kanzaki, “Pheromone processing center in the protocerebrum of *Bombyx mori* Revealed by Nitric

Oxide-Induced Anti-cGMP Immunocytochemistry”, *The journal of comparative neurology*, Vol. 480, pp. 340–351, 2005.

- [3] S. Wada and R. Kanzaki, “Neural Control Mechanisms of the Pheromone-Tiggered Programmed Behavior in Male Silkmths Revealed by Double-Labeling og Descending Interneurons and a Motor Neuron”, *The journal of comparative neurology*, Vol. 484, pp. 168–182, 2005.
- [4] T. Yamasaki, T. Isokawa, N. Matsui, H. Ikeno and R. Kanzaki, “Reconstruction and simulation for three-dimensional morphological structure of insect neurons”, *Neurocomputing*, Vol. 69, pp. 1043–1047, 2006.
- [5] K. A. Al-Kofahi, S. Lasek, D. H. Szarowski, C. J. Pace, G. Nagy, J. N. Turner and B. Roysam, “Rapid Automated Three-Dimensional Tracing of Neurons From Confocal Image Stacks”, *IEEE Trans. Inform. Teechnol. Biomed.*, Vol. 6, No. 2, pp. 171–187, 2002.
- [6] W. He, T. A. Hamilton, A. R. Cohen, T. J. Holmes, C. Pace, D. H. Szarowski, J. N. Turner and B. Roysam, “Automated Three-Dimensional Tracing of Neurons in Confocal and Brightfield Images”, *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 9, pp. 296–310, 2003.
- [7] B. Katz, “神経・筋・シナプス”, 医歯薬出版株式会社, 1970.
- [8] 鳥脇純一郎, “3次元デジタル画像処理”, 昭晃堂, 2002.
- [9] RV エディタ (RIKEN Voxcel Editor), http://www.riken.jp/lab-www/V-CAD/katsudo/vcat_team/rveditor/index.html

連絡先

中島 佳奈子, 三島 健稔
E-mail: {s06dm006,takemi}@mail.saitama-u.ac.jp
森下 壮一郎, 大武 美保子, 浅間 一
E-mail: {mori,otake,asama}@race.u-tokyo.ac.jp
加沢 知毅, 神崎 亮平
E-mail: {kazawa,kanzaki}@brain.imi.u-tokyo.ac.jp



Japan Society for Fuzzy Theory and Intelligent Informatics

日本知能情報ファジィ学会

第17回
インテリジェント・システム・シンポジウム
(FANシンポジウム)
講演論文集

Japan
Society
for
Fuzzy
Theory
and
Intelligent
Informatics