

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[†] 森下 壮一郎[‡] 加沢 知毅[‡] 大武 美保子[‡]
Kanako Nakajima Soichiro Morishita Tomoki Kazawa Mihoko Otake
神崎 亮平[‡] 浅間 一[‡] 三島 健稔[†]
Ryohei Kanzaki Hajime Asama Taketoshi Mishima
[†] 埼玉大学 [‡] 東京大学
Saitama University The University of Tokyo

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 $10^5 \sim 6$ 個程度の神経細胞で構成されており、人間の脳が $10^{10} \sim 11$ 個程度であるのに比べ遙かに少ない。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]。そのため現在、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の一つであり、構造の解明が重要視されている。また、三次元形状のモデル構築により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。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ー顕微鏡 (CLSM) で取得し、二値化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 pre motor neuron の断層画像を取得し、二次元に投影したものを図 2 に示す。断面画像の取得は次の手順で行う [2]。

1. 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
2. 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
3. CLSM より、中心軸のずれない高精度な断層画像を取得する

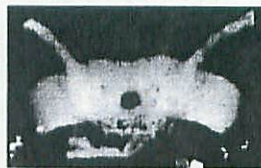


図 1: カイコガの脳



図 2: 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が、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 3 のように必要な神経

*第 17 回インテリジェント・システム・シンポジウムより転載

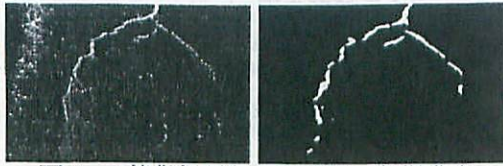


図 3: 二値化処理による形状の欠損発生

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、二値化の閾値設定を断層毎に人間が目測で行い、さらに二値化による欠損箇所の補正も手作業で行っている。

これまでも、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 [4]。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あるが、未だ手作業に頼る部分が多い [5]。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、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 4 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。

まず、二値化後のノイズがない画像について、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。

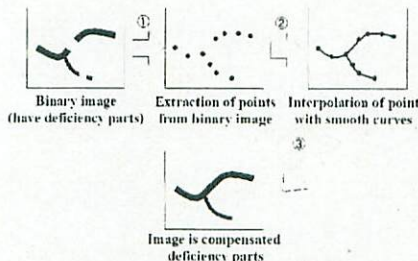


図 4: 提案手法の概略図

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 5 に一例を示す。

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 [6]。

そして、スケルトンの中から離散的に点を選出する。本稿では、スケルトンの任意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。

図 6 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 [6]。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 5 の画像からスケルトン抽出を行った結果を図 7 に示す。

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

図 5: ユークリッド距離変換画像



図 6: スケルトン抽出

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

図 7: 図 5 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 8 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。

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 9 で示すように、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

図 12 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 13 に示し、その分岐点を図 14 に示す。



図 13: 離散的な点の選出



図 14: 分岐点

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	$\sqrt{20}$

図 13 の点を Bezier 曲線で補間した結果を図 15 に示す。図 15 に対して距離値を補間し、補正画像を得た結果を図 16 に示す。

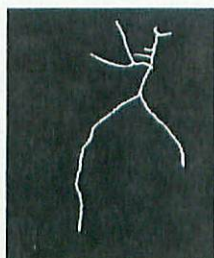


図 15: Bezier 曲線での補間結果

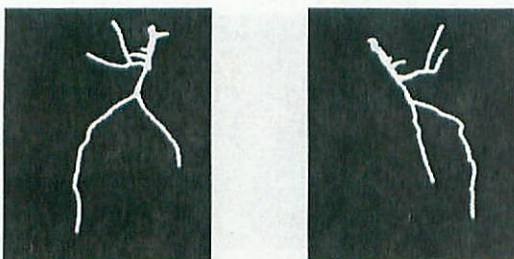


図 16: 補正画像

図 16 より、欠損箇所が補正され、神経細胞の形状がある程度抽出できていることがわかる。これより、提案手法が二値化による形状の欠損箇所の補正において有効であることを確認した。今後は、これを定量的に評価する必要がある。

本手法では、欠損箇所の補正のために候補点をグループ分けする指標として距離と角度を用いているが、距

離が近い点を優先にグループ分けを行っているので、先に選択された点の影響を大きく受けてしまう。このため、三点のみに注目したときは角度が大きいのが、全体的にみると角度変化が大きくなる場合がある。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、これを回避できると考える。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ために、画像を離散的な点の集合で表現し、それらの点を曲線で補間する手法を提案した。実データを用いた実験の結果、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確認した。

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] 外池光雄ら, “においと脳・行動”, フレグランスジャーナル社, 2003.
- [2] Y. Seki, et al, “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, et al, “Neural Control Mechanisms of the Pheromone-Tiggered Programmed Behavior in Male Silkworms Revealed by Double-Labeling og Descending Interneurons and a Motor Neuron”, *The journal of comparative neurology*, Vol. 484, pp. 168–182, 2005.
- [4] K. A. Al-Kofahi, et al, “Rapid Automated Three-Dimensional Tracing of Neurons From Confocal Image Stacks”, *IEEE Trans. Inform. Technol. Biomed.*, Vol. 6, No. 2, pp. 171–187, 2002.
- [5] W. He, et al, “Automated Three-Dimensional Tracing of Neurons in Confocal and Brightfield Images”, *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 9, pp. 296–310, 2003.
- [6] 鳥脇純一郎, “3次元デジタル画像処理”, 昭晃堂, 2002.
- [7] RV エディタ (RIKEN Voxcel Editor), http://www.riken.jp/lab-www/V-CAD/katsudo/vcat_team/rveditor/index.html

第13回 創発システム・シンポジウム

「創発夏の学校」 相互作用を考える

講演資料集

主催

計測自動制御学会 システム・情報部門

協賛

計測自動制御学会 システム・情報部門

身体・脳・環境の相互作用による適応的運動機能の発現に関する調査研究会

企画

計測自動制御学会 システム・情報部門

自律分散システム部会 知能工学部会 システム工学部会

2007年8月17日（金）～19日（日）

インテック大山研修センター