

画像処理エキスパートシステムによるマイクロ・
キャリア上動物細胞の視覚認識・計測法*福田敏男^{*1}, 長谷川 修^{*2}, 浅間 一^{*3}
長棟輝行^{*3}, 遠藤 勲^{*3}Recognition and Counting Method of Biological Cells on Microcarrier
Using Image Processing Based on Expert SystemToshio FUKUDA, Osamu HASEGAWA Hajime ASAMA,
Teruyuki NAGAMUNE, and Isao ENDO

This paper deals with the expert system for the recognition and counting of cells using image processing. The biological cells are taken from animals and cultured on microcarriers, plastic balls/beads 150-200 micrometers in diameter floating in a culture solution. Cell images are obtained through a microscope attached to a TV camera. The number of cells in the culture vessel increases during a 6-day, and the expert system recognizes the state of cell growth during this time by means of image processing. In particular, the expert system is a more effective way to recognize and cluster cells on densely grown/distributed beads from the gray image data than simple image processing. In this study, we also applied the creature-image-segmentation method, which has previously been proposed by the authors. With this method, we can recognize the cell shape and location, avoiding individual differences on the plastic balls. The effectiveness of this method is shown by experimental results.

Key Words: Application of Control, Expert System, Image Processing, Cell Cultivation, Counting Biological Cells

1. 緒 言

近年, 各種生理活性物質の生産媒体である動物細胞(以下これを細胞という)を, 溶液中に浮遊するマイクロ・キャリア(以下これをビーズという)に付着させ, 大量に培養する研究が各方面で行われている⁽¹⁾⁽²⁾. この方法は従来の培養方法に比べ細胞の培養の効率がよく, 新しい細胞培養法として注目されている. 今後この方法により生理活性物質の量産が可能になり, 医学等の分野に大きく貢献することが期待されている.

ところで現在は上記の方法において細胞の培養状況の判定は人間が行っているが, そのためには細胞の着色等の処理が必要であり非常に時間が掛かっている. そこで今後細胞の本格的な大量培養を図るためには, この過程の自動化が求められている. 本研究ではこのような背景に基づき, ビーズ上の細胞の培養状況を自動的に判定するための細胞画像認識エキスパートシステムを作成した. 本エキスパートシステムを用いれば単に画像処理により計測する場合に比べ, 段階的濃度差

や細胞の形状データからより精密な細胞の認識・計測が可能となる. 実験用のサンプルには細胞を6日間にわたり培養し, 着色したものおよび無着色のものを用いた. これは, 本過程のオフライン処理とオンライン処理を想定した場合にそれぞれ対応している.

また, 今後は遺伝子操作等のマイクロマニピレーションが活発に行われそれらの自動化が求められるようになるだろうが, 本研究はその際に必要となる画像処理およびエキスパートシステム, バイオデータベース等の構築のための基礎研究としても位置づけている.

2. 顕微鏡初期設定モード

画像処理においては入力される画像は画像入力時の周囲の環境に大きな影響を受ける. 本研究においては特に顕微鏡下のライトの光量に大きく影響され, 場合によっては本システムによる処理を安定に進めることができない. そこで本研究ではこのライトの光量を一定に保つために, 処理を始める前に画像処理を用いて自動的に顕微鏡からの入力画像の光量を測定し, 必要ならばオペレータに対し光量の調節を促すモードを設けた. 本モードによれば256段階の濃度値において±1濃度値までの判定が可能であるが, 実際には実用性を考慮して濃度値の差が±3以内であれば設定完了と

* 平成元年10月15日 第67期全国大会講演会において講演, 原稿受付 昭和63年12月5日.

^{*1} 正員, 東京理科大学工学部 (〒162 東京都新宿区神楽坂1-3).

^{*2} 学生員, 東京理科大学大学院.

^{*3} 理化学研究所 (〒351-01 和光市広沢2-1).

している。この値は実験により経験的に決定した。またオペレータへの出力は、濃度値の差を出力する他に日本文によっても出力し、オペレータの理解を助けるようにしている(図1)。

3. 細胞認識・計測
エキスパートシステム

3.1 エキスパートシステムの概要 本システムは、Prolog 言語を用いて記述されたエキスパートシステムにより統合的に運営されている。本システムの構成を図2に示す。図2に示すように本システムは大きく三つの部分から成り立っている。第1の部分は画像処理部である。ここでは、まず X-Y ステージ上の対象とする細胞の画像をカメラから画像処理コンピュータに入力する。次にその画像の処理を行った後、処理後のデータをホストコンピュータに送っている。第2の部分は演算処理部である。ここではホストコンピュータに送り込まれた画像データを Fortran 言語により数値処理し、細胞の長さ・面積等、後の認識・計測のためのデータを算出している。なおこの Fortran 言語部分はサブルーチン化した後に Prolog 言語とリンクして述語として登録してあり、Prolog 言語上において他の述語と同様に用いることができる。第3の部分は認識・計測部である。ここでは先に算出した各種のデータに基づきデータベースとの間で種々のマッチング等を行い、その結果から入力画像の細胞の認識・計測を行っている。各部の処理過程の詳細は次章に述べる。

3.2 データベース 本節では本研究におけるデータベースの構造を示す(図3)。本データベースはフレーム構造の形式を採っており、細胞の基本的形状データが入力されている点に特徴がある。本研究における基本的形状の定義については後述する。本データベースに入力されているデータ(ピクセル単位)を次に示す：細胞の基本的形状、細胞の長さ細胞の面積。

```

... 7771 1337 7331 7771 7771 ...

.   .   .   .   .   .   .   .   .   .
-20   -10   0   10   20
.....

TOTAL AVERAGE OF DIFFERENCE = 23

77 77711* 7 7771 7 7771 7 7771 7771 7771 7771
    
```

図1 顕微鏡初期設定モードにおけるオペレータへの出力例

4. 処理の流れ

4.1 フローチャート 本節では図4に本エキスパートシステムのフローチャートを示し、また画像の入力から認識・計測結果の出力に至る過程を前章で述べた三つの部分毎に処理の順を追って述べる。

4.2 画像処理部

4.2.1 ビーズの位置の検出 細胞のビーズ上での培養状況の判定処理を進めるためには、まず細胞が付着しているビーズの画像上における位置を検出する必要がある。ただしここでのビーズの位置の検出は後

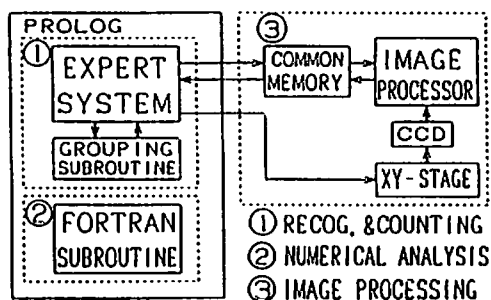


図2 システム構成

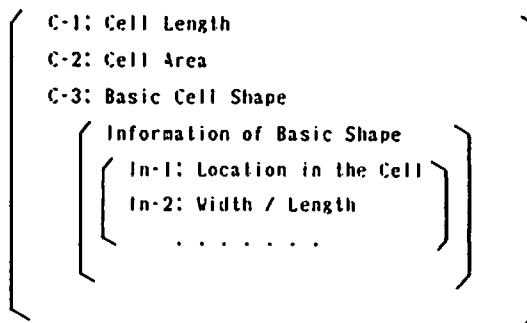


図3 データベースの構造

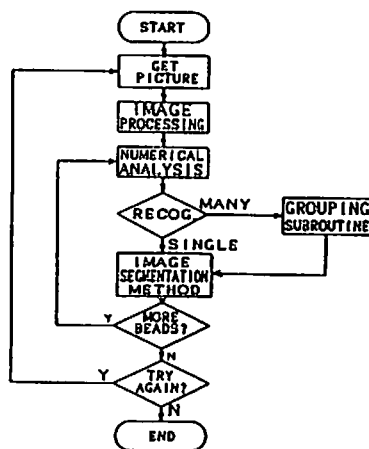


図4 フローチャート

述するウィンドウ設定が目的であるため、大まかなものでよい。以下にその方法を述べる。

(1) マスクパターン ビーズの位置の測定はマスクパターンを用いたパターンマッチング法を用いることにより行う。図5にマスクパターンを示す。マスクパターンは大小2種類作成した。これはビーズの大きさにばらつきがある(150~200 μm)ためである。図5においてパターン大とパターン小の半径は、大が52, 小が37であり、太さはどちらも12(単位:ピクセル)である。これらの値は実験により経験的に決定した。ただし、これらのパターンには若干のゆがみがあり、完全なリング状ではない。

(2) ビーズの位置の検出 図6に示すサンプルを例にとりビーズの位置の検出過程を示す。まず入力したビーズの原画像をノイズの除去を行った後に細線化する。パターンマッチングはこの画像を用いて行う。図7はマッチング処理中の画像である。マッチングパターンは画像の左上方から右下方に移動させる。このときマスクパターンと細線化されたビーズのエッジの画像が重なった領域の面積量により、両者のマッチング状況の判定を行っている。なお以上の処理過程は随時画像処理コンピュータの画像上に表示し、オペレータが処理の状況を確認できるようにしている(以下の各画像処理においても同様)。

4.2.2 大ノイズの除去 次に以上のようにして抽出されたビーズからビーズ上のノイズ(細胞以外の

画像)を除去する。ビーズ上のノイズには図8に示すようにいくつかの種類がある。これらのうちある大きさ以上の面積を持つもの(これを大ノイズと名付ける)について、その面積量から除去を行う。図9に大ノイズを除去する前の画像と大ノイズ除去後の画像を示す。ここで除去された大ノイズの面積量およびそれらの画像上における位置はビーズの位置の座標とともに保存され、後の細胞認識・計測の際に利用する。

上記の過程で除去されなかったノイズ(これを小ノイズと名付ける)は、エキスパートシステムによりその長さ・面積・形状から細胞と識別された後に除去される。その詳細については後述する。

4.3 データ処理部

4.3.1 データの転送

(1) まず入力した画像を表1のしきい値をもって5値化する。これにより細胞の影の最も濃い部分(こ

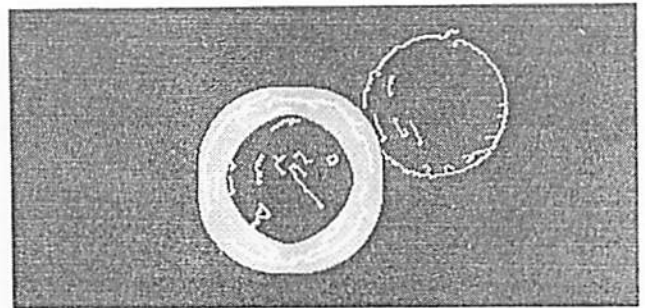


図7 マッチング処理

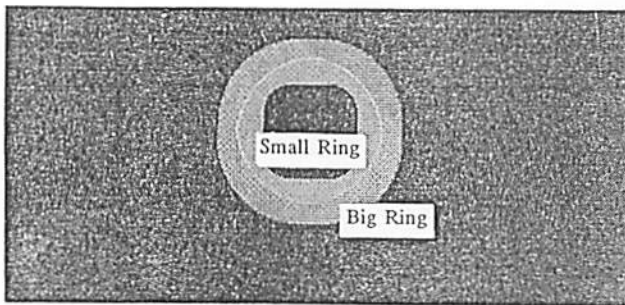


図5 マスクパターン

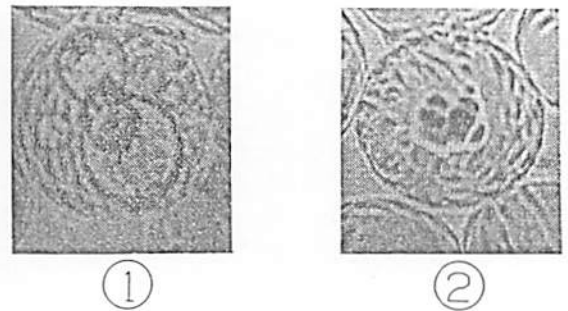


図8 ビーズ上のノイズの例

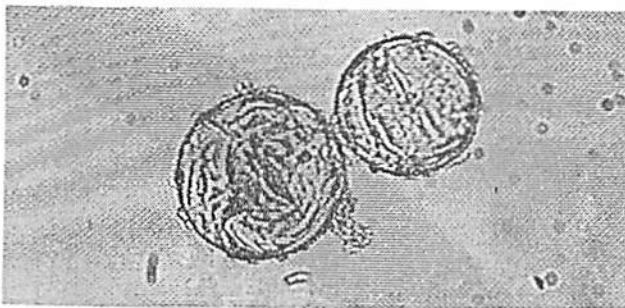


図6 原画像

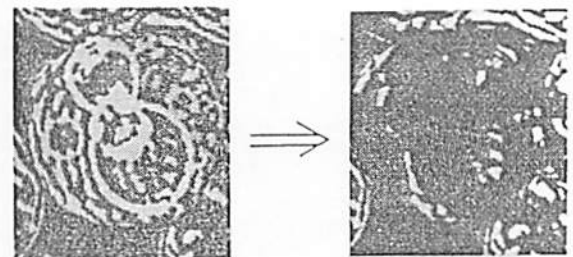


図9 大ノイズの除去

れを D1 とする。以下同様)・やや濃い部分 (D2)・普通の濃さの部分 (D3)・ビーズの表面が直接見えやや明るい部分 (D4)・ビーズの辺縁の最も明るい部分 (D5) に画像データを分けることができる。これらのしきい値は顕微鏡初期設定モードで設定したライトの光量にあわせてある。

(2) 次に 3 章で述べたビーズの抽出を行った後ビーズのまわりにウィンドウを設定する(図 10)。ここでウィンドウのサイズはビーズの大きさによらず一律にビーズを含む 120×120 ピクセルとしている。これは後の画像処理コンピュータからミニコンピュータ(ホストコンピュータ, エキスパートシステムが存在)へのデータの転送の際に, ウィンドウのサイズが決定されていたほうがタイムロスが少なくすむためである。

(3) (2)で設定したウィンドウ内のデータをミニコンピュータに転送する。この際, 画像データのビットを反転している。これは画像上で影となっている細胞部分のデータを大きい濃度値で(最大値は 255)示すほうが, データの重要性をオペレータにアピールしやすいと考えるためである。なおここから先の処理はデータ処理となるため画像処理コンピュータの画像上には表示されない。

4.3.2 ビーズの位置の正確な検出およびビーズ上のデータのみ抽出 さきに原画像における大まかなビーズの位置を検出したが, ここではウィンドウ内

のビーズの位置を正確に検出する。検出方法を以下に述べる。

(1) ウィンドウの中心から±5ピクセルのそれぞれの位置から, 先にかけたマスクが大の場合①半径 46~58・太さ 2, マスクが小の場合②半径 31~43・太さ 2, の円を仮想的に考える(図 11)。

(2) (1)で考えた円上に D5 が幾つ重なるかを計測する。

(3) (2)の結果データが重なっている数が最も多いときの中心位置をビーズの中心とする。

(4) ビーズの中心が決定した後, ウィンドウ内のビーズおよびビーズ上のデータのみを抽出する(図 12)。

4.3.3 データのナンバリングと面積の計測

(1) 転送されてきたデータに 5×5 ピクセルサイズのフィルタを用いてフィルタリングする。これにより, 各濃度値ごとにデータのナンバリングを行う。

(2) ナンバリングされた各データの面積をデータのピクセル数を数えることにより計測する。

4.3.4 小ノイズの除去 上記の過程を経て得られたデータのうち, D1 から D3 について各々データの個数を調べ, さらにその数に応じて各データの面積を表 2 に示す値 (D2 の場合の例) の範囲内にあるかどうかを調べる。その際, 表 2 の範囲内にないデータはノイズとして除去する。これはビーズ上に細胞が少ない場合は細胞の画像データは広い面積値を持ってはっきりと入力されるが, 細胞数が多くなるに従いビーズが

表 1 5 値化のためのしきい値

	DENSITY
D1	200 ~
D2	150 ~ 199
D3	120 ~ 149
D4	1 ~ 119
D5	0

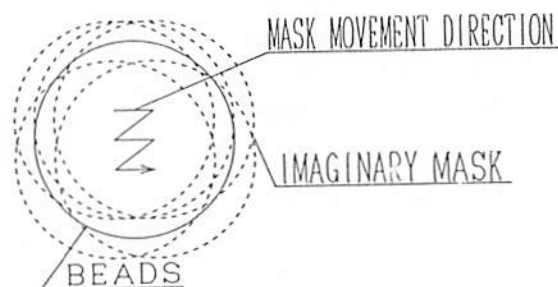


図 11 ビーズ位置の正確な検出方法

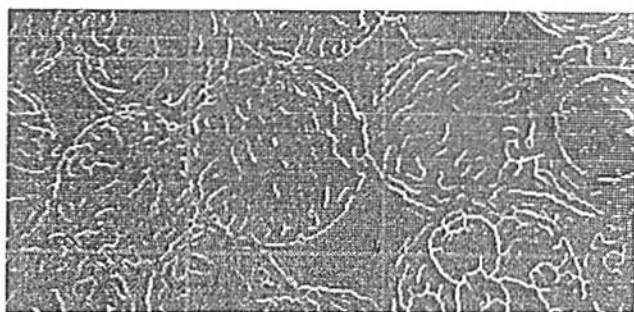


図 10 ウィンドウの設定

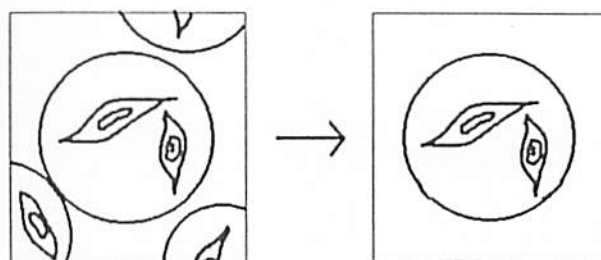


図 12 ビーズのウィンドウ内における精密抽出

細胞に覆われて暗くなるために各濃度値のデータの面積が小さくなるためである。表2に示す値は実験値を元に決定した。

4.4 認識・計測部

4.4.1 画像データのタイプ別分類 以上の過程を経て得られたデータは大きく四つのタイプに分けられる(図13)。これらのタイプの設定は実験により得られたデータを目視により確認した細胞の画像と比較することにより行った。ここで中心部・辺縁部の境はビーズの縁から10ピクセルとする。

表2 小ノイズ判定基準面積値

Num. of D2 Data	Slice Num. Range
1 — 10	20 — 40
11 — 30	25 — 45
31 — 50	13 — 30
51 — 70	8 — 20



(a) 中心部単独データグループ



(b) 中心部重複データグループ



(c) 辺縁部単独データグループ



(d) 辺縁部重複データグループ

図13 画像データのタイプ別分類

4.4.2 データのグループ別分類

(1) まずD1に着目し、すべてのD1に対しD1のすぐ隣に存在するD2のデータを同一のグループのデータとする。その際同一グループとみなされるD2のデータはいくつあってもよい。さらにD3のデータでD1かD2のすぐ隣に存在するデータも、そのD1かD2と同一のグループとみなす。

(2) 次に先の過程でグループ分けされなかったD2データに着目し、残ったすべてのD2データに対しD1の場合と同様にグループ分けを行う。

(3) 単独データグループと重複データグループ

(1)・(2)の処理において、グループ内に他のグループとデータを共有しているものがないグループは単独データグループとする。しかし他のグループとデータを共有しているグループは、重複データグループとする。

4.4.3 中心部・辺縁部データの分類 以上の過程に続き、さらにデータを中心部データと辺縁部データに分類する。分類方法はD1およびD2のデータグループのうち、ビーズの辺縁から数えて最も遠いデータでも10ピクセル以内にあるグループは辺縁部データとする。それ以外は中心部データとする(図14)。これによりすべてのデータグループは4.4.1項で分類した四つのタイプのどれかに分類される。

4.4.4 タイプ別認識方法

(1) 中心部単独データグループの場合 そのまま形状認識モードにはいる。

(2) 中心部重複データグループの場合 グループピングサブルーチンによりすべてのデータのグループ化を行った後に形状認識モードにはいる。

(3) 辺縁部単独データグループの場合 形状認識モードにはいるが、その際さらにデータを二つの段階に分ける。一つはビーズの辺縁から5ピクセル以内のデータであり、もう一つはビーズの辺縁から6ピクセル以上10ピクセル以内のデータである。前者においては5.3節で述べる各マッチングの成否判定基準値を

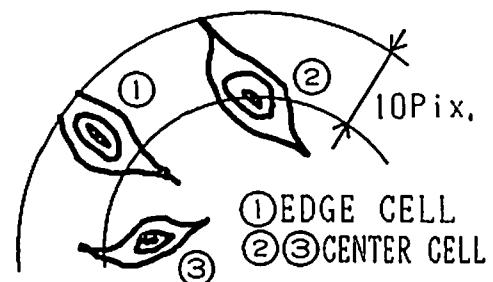


図14 辺縁部・中心部データの分類

30%以上とし、後者では50%以上とする。

(4) 辺縁部重複データグループの場合 まずグルーピングサブルーチンに入りデータをグループ化する。その後(3)と同様にデータをさらに2段階に分け、各マッチングの成否判定基準値を段階毎に設定しなおして認識を行う。

4.4.5 グルーピングサブルーチン 本サブルーチンでは、データが重複している場合そのグループ分けを行う。以下にその方法を示す。

(1) まず重複しているデータに対し3×3ピクセルサイズのフィルタをかけ、D1, D2データのすぐ隣に存在するD3のデータをそのD1, D2と同グループのデータとする。

(2) (1)の過程を繰返して行い、D1, D2データグループのまわりにD3データをちょうど木の年輪のように増やして行く(図15)。

(3) この際、最終的にちょうど幅1ピクセルのライン上にどちらにも分けられないデータが残る。これはどちらにも共通のデータとし、形状認識においては両グループにおいて形状データとして用いる(図16)。以上の様にしてデータのグループ分けを行う。

4.4.6 形状認識モード

(1) グループ分けされたデータの最も外縁に当たる部分の長さを算出する(図17)。

(2) 同じ外縁部の囲む面積量を算出する(細胞画

像の面積に相当)。

(3) 同じく外縁部のデータの基本的形状(後述)を計測する(図18)。

(4) 以上の三つのデータをデータベースの細胞データと比較し、細胞であるかどうかを認識・判定する。なお、本モードの原理および認識方法については5章でさらに詳しく述べる。

4.5 認識・計測結果の出力 本節では本システムにおける認識・計測の結果の出力例を示す(図19)。

5. 細胞の形状認識モードについて
(画像セグメント化法の適用)

5.1 細胞画像認識における生物の画像セグメント化法の適用方法 細胞などのように個体差が存在するものは特定のパターンを設定できないため、従来広く用いられてきたパターンマッチング法を適用することは難しい。そこで生物画像のセグメント化法を適用する。生物画像のセグメント化法の詳細については著者らは基礎研究を終え既に報告してきた⁽³⁾。

5.2 細胞の基本的形状の定義 本研究においては細胞の基本的形状というものを定義している。細胞の基本的形状は細胞(セグメント)の中心線をドット化し、各ドットごとの外形線までの距離をもって表す(図18)。これにより細胞をビーズ上での付着状態や見

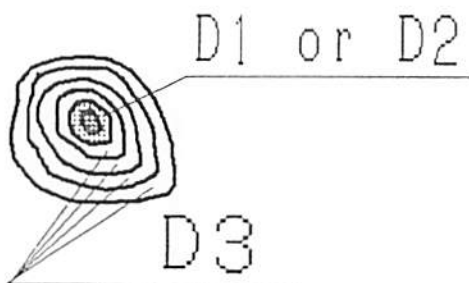


図15 フィルタリングの方法

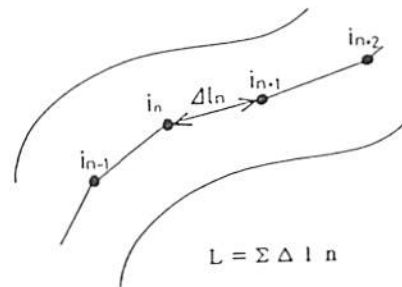


図17 長さの算出

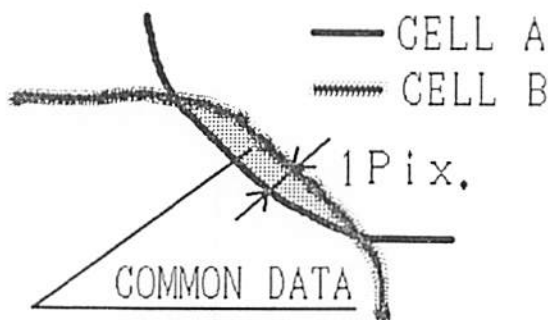


図16 最終共通データの処理

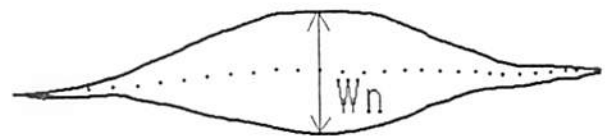


図18 基本的形状の計測

```

*** ショリ ケツカ ショブリョク ***
ショリ ビ-ズ スク      10
ノイケン サイキク スク  10.28
スライ ノイソク コツク  2
    
```

図19 結果出力

る方向によらず常に単一のデータをもって表すことができる(図 20)。すなわち本研究における細胞の画像のセグメント化法の適用とは、

[細胞がどのような状態でビーズ上に存在しようとも、細胞の長さ・面積・基本的形状は変化しない]
という仮定に基づき、細胞を表現し認識を行うものである。

5.3 認識過程

5.3.1 細胞の長さのマッチング 対象細胞データとデータベース中の細胞の長さの値を比較、マッチングする。その結果、差が 20% 以内ならばマッチング成功とする。

5.3.2 細胞の面積のマッチング 対象細胞データとデータベース中の細胞の面積を比較、マッチングする。その結果、差が 20% 以内ならばマッチング成功とする。

5.3.3 細胞の基本的形状のマッチング 対象細胞データとデータベース中の細胞の基本的形状を比較、マッチングする。その結果、差が 20% 以内ならばマッチング成功とする(図 21)。

5.3.4 認識方法 以上のマッチングのすべてに成功した場合対象データは細胞と判断するが、マッチングしない場合はそのデータはノイズと判断し除去する。

6. 実験および結果

6.1 実験装置 実験は図 22 に示す装置を用いて

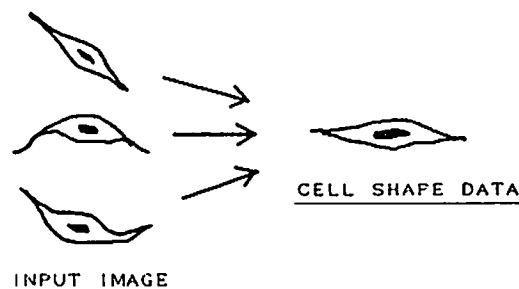


図 20 単一のデータによる表現

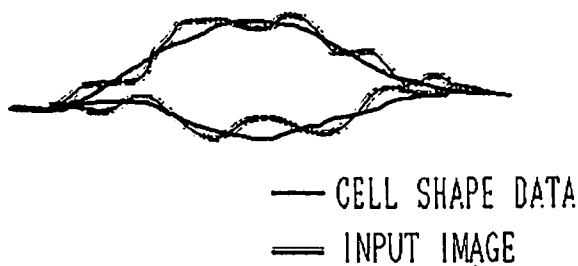


図 21 形状のマッチング

行った。細胞は XY-STAGE 上のスライドガラス上に乗っている。HOST コンピュータは画像処理コンピュータを COMMON 領域を介してコントロールしている。また XY-STAGE は同じく DIO を介して HOST コンピュータによりコントロールされている。これにより本システムは人間を介しない閉ループをなし、ビーズの画像を連続して自動的に画像処理コンピュータに入力・処理することができる。CCD-CAMERA は顕微鏡と接続されている。この顕微鏡の倍率は 400 倍である。なお入力される処理対象画像は白黒画像であるが、画像処理コンピュータの画像上には合成したカラー画像を表示している。

6.2 実験方法 実験には細胞を 6 日間にわたりビーズ上で培養した後、①人工的に着色したもの(クリスタルバイオレットにより着色)および、②無着色(自然状態)のものを用いた。実験は細胞のついているビーズの画像を顕微鏡に接続された CCD カメラより入力し、その培養状況を判定させることにより行った。その際、実験段階を

1. 着色細胞をエキスパートシステムを用いず画像処理のみにより判定
2. 無着色細胞をエキスパートシステムを用いず画像処理のみにより判定
3. 着色細胞をエキスパートシステムを用いて判定
4. 無着色細胞をエキスパートシステムを用いて判定

という四つの段階に分け、相互に比較することとした。また各実験結果についても、人間が目視により細胞数を計測・判定した場合(これを正解とする)と比較し評価した。

6.3 実験結果 実験結果を図 23~図 26 にまとめる。各図はビーズ上の細胞数の計測結果を、人間が行った場合と比較したものである。このうち、図 23、図 25 は着色細胞を用いた結果、図 24、図 26 は無着色細胞を用いた結果である。

6.4 まとめ 以上の結果、着色細胞と無着色細胞の視覚認識では着色細胞の視覚認識のほうが若干良好な結果が得られることがわかった。これは着色細胞

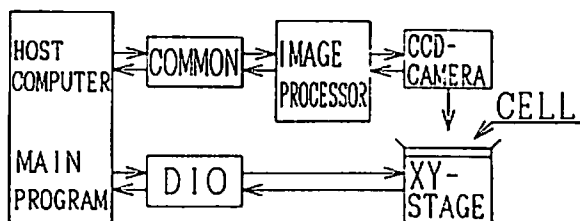


図 22 実験装置

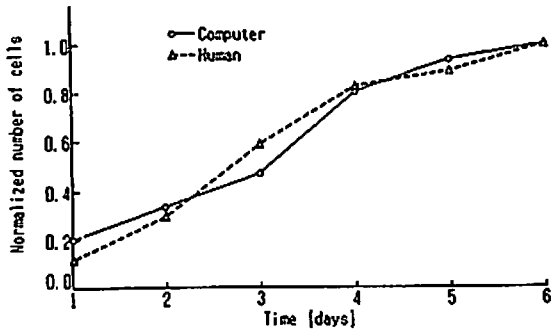


図 23 着色細胞認識結果 (画像処理のみ)

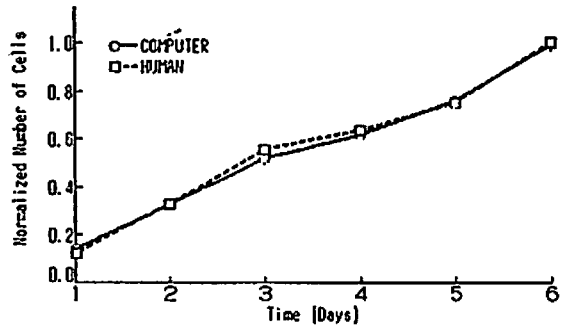


図 25 着色細胞認識結果 (エキスパート使用)

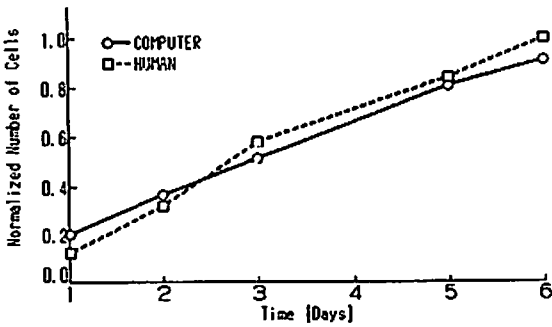


図 24 無着色細胞認識結果 (画像処理のみ)

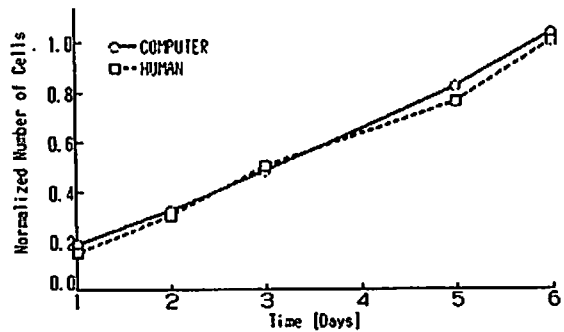


図 26 無着色細胞認識結果 (エキスパート使用)

のほうが視覚的に細胞の画像を捕えやすいためである。またエキスパートシステムを用いる場合と用いない場合では、前者は後者に比べ判定を下すまでに約半分の処理時間(約1時間)で済むことが判明した。これは判定に必要な処理対象サンプル数が3分の1(ビーズ10個)程度で済むためである。さらに、本エキスパートシステムを用いれば細胞が密集している部分においても細胞画像の数え分けが可能であり、人間が目視により計測した場合とほぼ等しい精密な計測が可能であることが判明した(図25, 26)。

7. 結 言

本研究においてビーズおよびビーズ上の細胞を画像処理的に抽出後認識・計測し、細胞の培養状況の判定をエキスパートシステムを用いて自動的に行うことを試みた。またその有効性を実験により確認した。これにより、現在人間が行っている処理過程の自動化への

可能性を示し得たと考える。しかし現在の方法では、一つのビーズを抽出・処理するまでに5分程度(ビーズ上の細胞数によって異なる)かかるため、10個のビーズを処理し判定を下す場合、1時間弱の時間がかかってしまう。このためリアルタイム処理の実現のためには改良の必要があり、これは今後の課題となっている。終わりに、本研究を遂行するにあたりご協力いただいた(株)東レに感謝する。

文 献

- (1) 山崎・塩田, 動物細胞の大量培養, 化学工学, 50-6(1986), 35.
- (2) 小林, ヒト繊維芽細胞によるβ型インターフェロンの生産(4), BIO INDUSTRY, 4-6(1987), 473.
- (3) 福田・長谷川, マイクロマニプレータの制御(第2報, 画像処理を用いた生物の認識・同定法), 機論, 55-512(1989-4), 959.

討 論

〔質問〕 谷 下 一 夫〔慶応義塾大学理工学部〕

バイオテクノロジーにおいて、細胞培養技術は重要な役割を果たしているため、有用性が増すと思われる培養細胞の自動計測のシステムを開発されたことに敬意を表す。以下の二点についてお伺いしたい。

(1) 対象細胞を認識するときのマッチングの差の限度を20%としておられるが、その根拠は何か。

(2) 人間の目視によるデータを基準として、システムの信頼性を評価しておられるが、人間の目視によるデータを基準にする妥当性についてコメントをいただきたい。

〔回答〕 (1) マッチングの差の限度を20%としたのは、本システムによる実験データを基にしてい

る。20%という値はマッチングエラーの許容範囲としては大きい値であるが、本研究では細胞画像とノイズの見分けが主目的であるため、大きく設定した。またビーズの辺縁部の細胞の画像は中心部のそれと比べてだいぶ見え方が異なるため、許容範囲をある程度大きくとる必要もあった。

(2) 本研究で対象とした細胞の画像は、人間が目視した場合は比較的容易に識別できる。このため、人間が識別した結果を正答とし、システムの評価を行った。実際、現在稼働中のプラントでは目視により培養状況の確認が行われており、この目視の結果にいかにか近づけ、かつ人間と比較してトータルで処理に要する時間を短縮することが本研究の目的であった。