

## SqueezeNet を用いた顕微鏡画像からの血中循環がん細胞の自動識別 Automatic Identification of Circulating Tumor Cells in Microscope Images Based on SqueezeNet

中道 一貴<sup>†</sup>      陸 慧敏<sup>‡</sup>      金 亨燮<sup>†</sup>      米田 和恵<sup>‡</sup>      田中 文啓<sup>‡</sup>  
Kazuki Nakamichi    Huimin Lu    Hyoungeop Kim    Kazue Yoneda    Fumihiro Tanaka

### 1. はじめに

近年、がん検査のためのバイオマーカーとして血中循環がん細胞 (CTC : circulating tumor cells) に注目が集まっている。CTC とは、腫瘍組織から遊離して血液中へと浸潤し、全身を循環する腫瘍細胞であり、がんの転移に寄与するとされている。患者の血液を採取し、そこに含まれる CTC の数を計測することにより、がんの早期発見や抗がん剤の治療効果の評価が可能であるとされている[1]。CTC の解析には様々な手法が存在するが、高い精度で CTC の検出が可能ツールとして Universal CTC-Chip の研究が進んでいる[2,3]。これは、表面に多数の微小の突起状の構造をもつ、高分子マイクロ流体デバイスである。このデバイスの表面は任意の抗体でコーティングすることが可能であるため、血液中の CTC を高い確率で捕捉することができる。病理学者は、血液サンプルをチップに注入し、抗体を用いて特定の細胞を捕捉する。捕捉される細胞には、CTC 以外にも存在するため、細胞の蛍光反応パターンを組み合わせを用いて CTC の識別を行う。表 1 に CTC の蛍光反応パターンを示す。同表において、「+」は陽性反応、「-」は陰性反応を示す。ここで、サイトケラチンは赤色光、白血球は緑色光、細胞核は青色光に反応する。本論文では、細胞の蛍光発色と撮影に Leica 社の倒立顕微鏡 DMi8[4]を用いた。病理学者は撮影された 3 種類の画像から表 1 の特徴をもつ細胞の検出を行うが、血液に含まれる細胞に対し、CTC の存在割合は非常に低いため、作業に多大な労力と時間を要する。さらに、識別が判定者の主観に依存するという問題もあるため、画像処理を用いた CTC の定量的な自動識別手法が求められている。

先行研究で Tsuji らは、論理積と Artificial Neural Network (ANN) を用いた 2 種類の CTC の自動検出手法を提案している[5]。Tsuji らの手法は、最初に複数のフィルタリング処理により、画像中から細胞領域を抽出する。次に、抽出された領域の統計的特徴量を計算し、ANN を用いた識別を行った。しかし、識別に使用する特徴量を手動で選択する必要があるため、汎用性の面で課題があった。論理積を用いた手法では、3 種類の画像に対して関心領域 (region of interest : ROI) を設定し、それぞれの ROI に対するセグメンテーション処理を加え、細胞が存在するかどうかの判断を行う。ここで得られた結果が、表 1 のパターンを満たすものを CTC として識別した。しかし、セグメンテーション手法に識別結果が依存するという問題があった。

ところで近年、画像認識の分野で畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network : CNN) が注目されている。CNN は画像から識別に有効な特徴量を自動で

<sup>†</sup>九州工業大学 Kyushu Institute of Technology

<sup>‡</sup>産業医科大学 University of Occupational and Environmental Health

抽出することができる手法であり、医用画像の分野においても高い性能を発揮している[6]。そこで本論文では、CNN モデルの一つである SqueezeNet[7]を用いた CTC の自動検出手法を提案し、その有効性を述べる。

### 2. 手法

まず、Universal CTC-chip を使用し、血液サンプル 1[ml] から特定の細胞の捕獲を行う。本論文では、健康な人の血液にがんの細胞株を付加したものを血液サンプルとして使用する。なお、健康な人の血液の使用は、倫理委員会で審査され認証されている。また、本論文で使用した細胞株は、ヒト肺腺癌由来の細胞株 (PC-9) とヒト胸膜中皮腫由来の細胞株 (ACC-MESO-4) の 2 種類である[2]。サンプル 2, 5 には ACC-MESO-4, サンプル 3, 4, 6 には PC-9 を付加し、サンプル 1 は細胞株を付加していない血液を使用する。表 1 に示す 3 種類のターゲットを反応させ、DMi8 によって顕微鏡画像を生成する。生成された画像の例を図 1 に示す。同図に示す 3 枚の画像は、視認性向上のため本来の画像の一部分を切り出したものであり、さらにコントラスト強調などの加工を加えている。

本論文では、この 3 種類の画像を使用し、CTC を自動識別する手法を提案する。我々が提案する手法は、大きく分けて「細胞領域の検出」と「CTC の識別」の 2 つのステップで構成される。まず、赤色画像において細胞領域の検出を行う。次に、赤色画像から抽出された細胞の座標情報を用い、ROI を赤、緑、青色画像それぞれに設定する。最後に、抽出された 3 枚の画像を使用し、その細胞が CTC か否かの識別を行う。以下にその詳細を述べる。

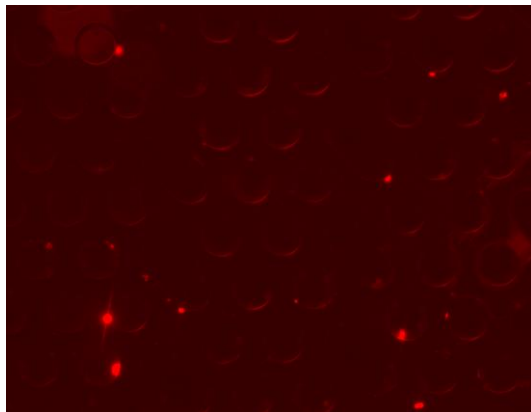
#### 2.1 赤色画像上の細胞領域検出

前述のように、顕微鏡で撮影される画像は赤、緑、青色の 3 種類である。この 3 枚の画像はチップ上の同じ座標で撮影されたものであるため、赤色画像上の細胞領域を検出し、青色と緑色画像の同じ座標を参照することにより、CTC の識別を行う。ここで、最初に赤色画像から検出を行うのは、他のチャンネルと比較して細胞が明瞭であり、また含まれる細胞の数が少ないためである。これにより、領域検出の計算コストの削減を行うことが可能である。

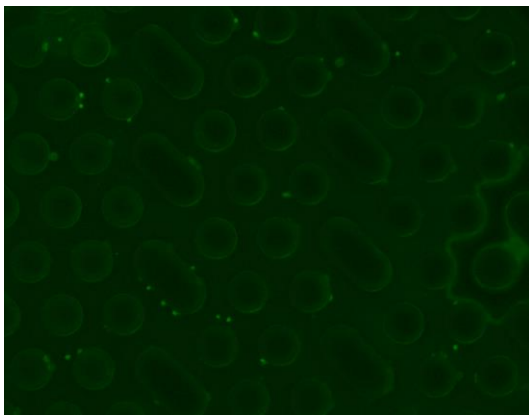
画像処理による細胞領域検出の流れを図 2 に示す。まず、選択的強調フィルタ[8]を用いた細胞領域の強調を行う。これは、ヘッセ行列の固有値解析により、画像中の任意の大きさの点成分や線成分を選択的に強調する手法である。本

表 1 CTC の蛍光反応パターン

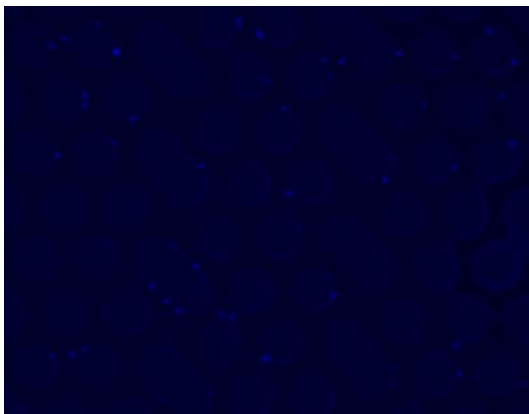
	サイトケラチン (赤色)	白血球 (緑色)	細胞核 (青色)
反応	+	-	+



(a) サイトケラチン (赤色画像)



(b) 白血球 (緑色画像)



(c) 細胞核 (青色画像)

図 1 顕微鏡画像の例

論文では、検出対象の細胞領域は円形に近いため、点成分を強調するフィルタを適用する。また、強調する最小の直径を 9、最大の直径を 33 とし、平滑化のスケールを  $N = 5$  とした。これらは実験的に求めた値であり、このフィルタは Tsuji らの手法[5]でも使用されている。

次に強調結果に対し、複数の閾値を用いた二値化処理を行った後、プロブ解析[9]を行う。プロブ解析とは、二値画像上のラベル付けされた塊の特徴量を解析する処理である。本論文では、使用する特徴量を面積、円形度、慣性比、凸



図 2 細胞領域検出の流れ

度の 4 種類とする。閾値を 10 回変更して二値化処理を行い、得られた 10 枚の画像に対し、設定した 4 種類の特徴量の条件を 5 枚以上の画像で満たす領域を細胞領域として検出する。この処理により、複数の二値画像において安定的に細胞に近い形状を示す領域を検出することが可能となる。ここで特徴量の条件の範囲は実験的に、面積：[40, 400]、円形度：[0.6, 1.0]、慣性比：[0.3, 1.0]、凸度：[0.7, 1.0]とした。検出された領域を細胞候補領域として  $64 \times 64$ [pixel]の ROI を設定する。

設定した ROI に対し、2 段階の二値化処理を行う。これは、判別分析法[10]による二値化処理を行い、さらに閾値を超えた領域の画素値のみを用い、再び判別分析法による二値化処理を行うものである。この処理により、淡い細胞領域であっても検出することが可能となる。最後に、二値画像に対するノイズ除去を行う。すなわち、二値画像上の面積が 10 以下、400 以上、または円形度が 0.5 以下の領域をノイズ成分として除去し、それ以外の領域を細胞領域とみなしてその重心座標を求める。ここで得られた重心座標を用い、赤、緑、青色のそれぞれの画像から  $32 \times 32$ [pixel]の ROI の切り出しを行う。

## 2.2 CTC の識別

前述から得られる 3 種類の画像を用いて CTC の識別を行うため、CNN の一種である SqueezeNet[7]を用いた識別器を構築する。CNN は対象を識別するための最適な特徴量を、学習により自動で抽出することができる。本論文で用いた SqueezeNet は、少ないパラメータ数で高い識別性能を発揮するモデルである。ネットワーク構造の概要を図 3 に示す。SqueezeNet の特徴として、図 4 に示すような Fire module と呼ばれる構造がある。図 3, 4 において、Conv は畳み込み層、Pool は最大プーリング層、BN はバッチ正規化、FC は全結合層を示す。Fire module では、squeeze 層で  $1 \times 1$  の畳み込みによって特徴マップの次元の削減を行い、その出力

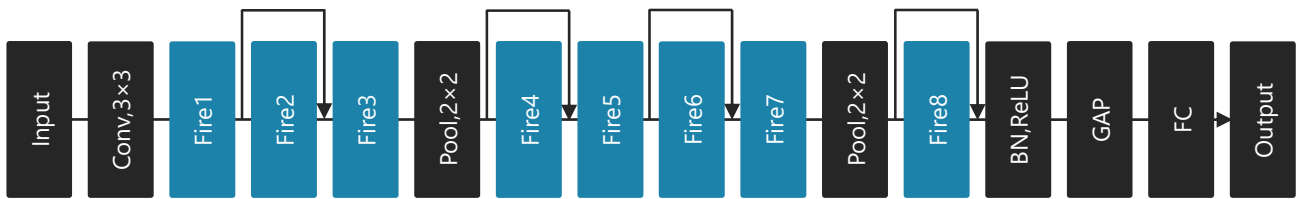


図 3 SqueezeNet の概要

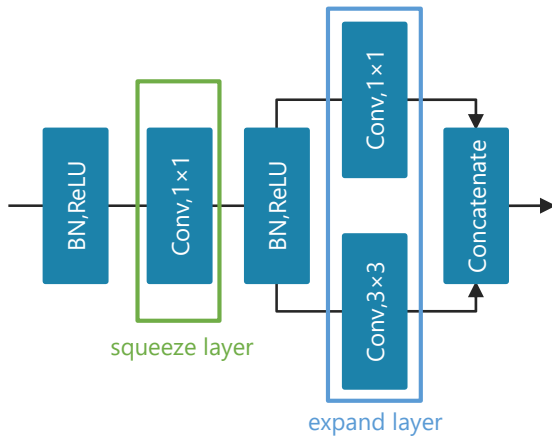


図 4 Fire module の詳細

結果を expand 層の 3×3 の畳み込みによって特徴抽出を行いつつ次元の復元を行うが、その一部を 1×1 の畳み込みで置き換えることにより、パラメータの削減を行っている。隣接する画素との関係性をとらえることのできる 3×3 の畳み込みに対し、1×1 の畳み込みでは各特徴マップにおける特定の単一画素間との関係性をとらえることが可能である。

SqueezeNet の入力画像には、切り出した RGB の 3 色の画像を合成することにより作成したカラー画像を使用する。ここで、CTC は存在する数が非常に少ないため、データセットに偏りが生じる。そこで本論文では、もともとの CTC データの赤色と青色画像の組み合わせを変更することによるデータ拡張を行った。表 2 に示すように、CTC は緑色画像上で反応がなく、赤色と青色画像上に反応がある細胞である。そこで、同じ座標上の細胞の組み合わせでなくても、この条件を満たすように別の座標上の 3 色の CTC 画像を組み合わせることにより、疑似的に新しい CTC データを生成することができる考えた。

### 3. 実験と結果

本論文では、6 サンプル分の画像 5040 枚に対し提案手法を適用した。サンプル 1, 4 には 270×3 枚、それ以外の 4 サンプルは 285×3 枚の画像が含まれている。また、これらの画像サイズはすべて 1296×966[pixel]である。なお、識別に用いた SqueezeNet の学習には、Adam (Adaptive Moment Estimation) を用いて最適化を行った。ハイパーパラメータは学習率を 0.001、バッチサイズを 128、最大イテレーション数を 20000 としている。さらに、データ不足による過学習の軽減のため、CTC データについては前述の処理を加

え、非 CTC の細胞画像については様々な変換処理を加えることでデータ拡張を行った。具体的には、画像に対して回転、垂直方向反転、水平方向反転、垂直方向シフト、水平方向シフトをランダムで適用した。

提案手法の性能評価には、真陽性率 (True positive rate : TPR)、偽陽性率 (False positive rate : FPR) を用いる。それぞれを導出する式を以下に示す。

$$TPR = \left\{ \frac{a}{a+b} \right\} \times 100 \quad (1)$$

$$FPR = \left\{ \frac{c}{c+d} \right\} \times 100 \quad (2)$$

ここで、 $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  は、表 2 の混同行列に示す領域に属する細胞領域の数を表している。同表において、ground truth とは、各サンプルに含まれる CTC の正解データであり、病理学の専門医が手動で作成したものである。また、陽性は CTC、陰性は非 CTC を表している。本論文では、Leave-one-out cross validation 法を用いて提案手法の平均的な識別性能評価を行った。これは、標本群からサンプルを一つ取り出してテストデータとし、それ以外を訓練データとする手法である。提案手法の性能評価の結果を表 3 に示す。結果として、真陽性率：97.30[%]、偽陽性率：3.150[%]となった。

さらに、Tsuji らの手法[5]を用いた CTC の自動識別を行った場合の実験結果を同表の(b), (c)に示す。結果として、論理積を用いた場合は、真陽性率：95.27[%]、偽陽性率：6.172[%]となり、ANN を用いた場合は、真陽性率：93.24[%]、偽陽性率：8.003[%]となった。以上より、Tsuji らの手法と比較し、提案手法において TPR の向上および FPR の改善がみられた。

### 4. 考察

本論文では、CNN の一種である SqueezeNet を用いて顕微鏡画像から CTC を自動識別する手法を提案した。また 6 サンプル、5040 枚の画像に提案手法を適用し、性能評価により提案手法の有用性を確認した。

表 3 より、Tsuji らの手法[5]と比べて精度の向上がみられた。同表(c)の論理積を用いた識別では、赤、緑、青色画像上に設定した ROI に対してセグメンテーションを行い、細

表 2 混同行列

		ground truth	
		陽性	陰性
提案手法による 推定結果	陽性	$a$	$c$
	陰性	$b$	$d$

表3 CTC 識別の性能評価

(a) 提案手法

サンプル 番号	TPR[%]	FPR[%]	CTC[個] (a + b)	非 CTC[個] (c + d)
1	100.0	2.004	1	449
2	84.62	0.922	13	434
3	97.06	3.978	68	1081
4	100.0	3.712	16	916
5	100.0	3.896	6	77
6	100.0	3.203	44	281
平均	97.30	3.150	24.67	539.7

(b) 論理積[5]

(c) ANN[5]

サンプル 番号	TPR[%]	FPR[%]	TPR[%]	FPR[%]
1	100.0	7.582	100.0	7.992
2	69.23	6.184	53.85	3.357
3	97.06	4.285	97.06	6.490
4	93.75	9.591	100.0	8.513
5	100.0	10.67	100.0	29.33
6	100.0	2.632	95.45	16.67
平均	95.27	6.172	93.24	8.003

胞の有無の結果が表1を満たすものをCTCとしている。この手法では、1組の画像データの情報のみを用いてしか識別を行うことができなかった。しかし提案手法では、大量のデータを用いて学習を行い、統計的な情報を用いて識別を行っているため、識別精度が向上したと考えられる。

また、表3のANNを用いた識別では、赤、緑、青色画像上に設定したROIに対し、ヒストグラム解析などを用いて特徴量を計算する。そこで得られた111次元の特徴量を入力としたANNによる識別を行っているが、これらの特徴量は手動で設計されたものであるため、識別に適した特徴量を選択できていない可能性があった。しかし、提案手法ではCNNモデルを使用することにより、人の手を介在することなく学習が行われ、その結果が精度向上につながったと考えられる。さらに、CTCはRGBの各チャンネルの組み合わせのパターンにより識別が行われるが、本論文で用いたCNNモデルのSqueezeNetは、各特徴マップ間の関連性をとらえることのできる1×1の畳み込み層を保有しているため、これも精度向上に貢献したのではないかと考えられる。

今後のさらなる精度向上のためには、モデルの改善が必要である。SqueezeNetに入力する画像サイズは32×32[pixel]と小さいため、画像のサイズを小さくしても必要な情報が失われないような工夫が必要である。さらに、より汎用的

な識別器を構築するため、データ数を増加させたうえで学習を行う必要があり、これらは今後の課題である。

## 5. まとめ

顕微鏡画像からSqueezeNetを用いたCTCの自動識別法を提案し、Leave-one-out cross validation法により性能を評価した。6サンプル、5040枚の画像に提案手法を適用し、真陽性率：97.30[%]、偽陽性率：3.150[%]という良好な結果を得た。さらなる精度向上のため、データ数を増加させたうえでの学習や、CNNモデルの改善を行う必要があり、これらは今後の課題である。

## 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金(16K10697)の補助を受けている。

## 参考文献

- [1] F. Tanaka, K. Yoneda, S. Hasegawa, "Circulating Tumor Cells (CTCs) in Lung Cancer: Current Status and Future Perspectives", *Lung Cancer: Targets and Therapy*, Vol.1, pp.77-84 (2010).
- [2] Y. Chikashi, K. Yoneda, T. Ohnaga, F. Tanaka, "EpCAM-independent Capture of Circulating Tumor Cells with a 'Universal CTC-chip'", *ONCOLOGY REPORTS*, Vol.37, pp.77-82 (2017).
- [3] K. Yoneda, T. Kuwata, Y. Chikashi, M. Mori, M. Kanayama, M. Takenaka, S. Oka, A. Hirai, N. Imanishi, K. Kuroda, Y. Ichiki, T. Ohnaga, F. Tanaka, "Detection of circulating tumor cells with a novel microfluidic system in malignant pleural mesothelioma", *Cancer Science*, Vol.110, No.2, pp.726-733 (2019).
- [4] Leica, Products, <https://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/p/leica-dmi8-id/> (2019).
- [5] K. Tsuji, H. Lu, J. K. Tan, H. Kim, K. Yoneda, F. Tanaka, "Detection of Circulating Tumor Cells in Fluorescence Microscopy Images Based on ANN Classifier", *Mobile Networks and Applications*, DOI: 10.1007/s11036-018-1121-0 (2018).
- [6] 本谷 秀堅, "ディープニューラルネットワークの医用画像処理分野から見た研究動向", *医用画像情報学会雑誌*, Vol.34, No.2, pp.39-44 (2017).
- [7] F. N. Iandola, M. W. Moskewicz, K. Ashraf, S. Han, W. J. Dally, K. Keutzer, "Squeezenet: Alexnet-level Accuracy with 50x Fewer Parameters and <0.5mb Model Size". *arXiv preprint arXiv:1602.07360*, (2016).
- [8] Q. Li, S. Sone, K. Doi, "Selective Enhancement Filters for Nodules, Vessels, and Airway Walls in Two- and Three-dimensional CT Scans", *Medical Physics*, Vol.30, No.8, pp.2040-2051 (2003).
- [9] T. Lindeberg, "Detecting Salient Blob-like Image Structures and Their Scales with a Scale-space Primal Sketch: A Method for Focus-of-attention". *International Journal of Computer Vision*, Vol.11, No.3, pp.283-318 (1993).
- [10] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms", *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, Vol.9, No.1, pp.62-66 (1979).