

ディープラーニングを用いてDIC画像から細胞領域を高精度にセグメント

細胞の移動性や占有面積の定量化は、細胞機能に関する生物学・医学研究にとって重要な手法である。物理的に形成した、細胞のない領域（ギャップ）に細胞が移動する速度を定量測定するスクラッチアッセイは、発生や分化、癌細胞の浸潤や転移などにおける細胞の移動性を評価する一般的な手法として知られている。しかし、透過顕微鏡画像を手作業で処理し、定量化するには膨大な時間を要する。また、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsに搭載のスクラッチアッセイ専用アプリケーションであるWound Healing機能は、概ね正しい傾向を掴むことはできるが、細部の検出精度には限界がある。

本アプリケーションノートでは、NIS-Elements に搭載のNIS.ai機能により、スクラッチアッセイの定量化を実施した例を紹介する。本例により、NIS.aiが少ない教師画像で、既存のWound Healingよりも高精度な推論が可能であることが示された。

材料

細胞・試薬

- ・ HeLa cells
- ・ Minimum Essential Medium Eagle With Earle 's salts (Sigma-Aldrich, M4655)
- ・ FluoroBrite™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, A1896701)
- ・ Fetal Bovine Serum, qualified, USDA-approved regions (Thermo Fisher Scientific, 10437028)
- ・ L-Glutamine (200mM) (Thermo Fisher Scientific, 25030081)
- ・ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, 15140122)
- ・ Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermo Fisher Scientific, 25200072)
- ・ DPBS, no calcium, no magnesium (Thermo Fisher Scientific, 14190144)
- ・ EZVIEW®CulturePlateLB (AGCTECHNO GLASS, 5816-006)
- ・ プラチナ柔フィルター付チップ-10 μ L (BMBio, WF-10RS)

観察装置・ソフトウェア

- ・ 顕微鏡：Ti2-E (Nikon)
- ・ 対物レンズ：CFI S Plan Fluor ELWD 20x, NA 0.45 (Nikon)
- ・ CMOS：ORCA Flash4.0 V3 (Hamamatsu)
- ・ 画像取得ソフトウェア：NIS-Elements (Nikon)
- ・ ステージトップインキュベーター：STX series (TOKAI HIT)

方法

HeLa cellsを70%前後のコンフルエンスで6ウェルプレートに播種し、約1日培養した。それらの細胞をマイクロピペット用の10 μ Lチップの先端を用いてライン状に剥離し、DMEM培地で3回洗浄除去した。

ステージトップインキュベーターにより、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂環境を維持し、スクラッチ領域を含む視野のDIC 画像（16 bit、2048 \times 2044 pixels）を、10分間隔で32時間撮影した。

教師データには、推論用データとは異なる視野のタイムラプス画像から、細胞密度の異なる16枚を選び使用した。NIS-Elementsの既存のアプリケーションであるWound Healingを用いて大まかにバイナリデータを作成したのち、手作業で修正することによりアノテーション作業の省力化を図った（Fig.1）。この教師データをNIS.aiのSegment.ai機能を用いて1000回学習させることにより、モデルを作成し、推論を実施した。

NIS.aiによるセグメント画像とWound Healingのみによるセグメント画像から、スクラッチ領域の面積[μ m²]を導出した。それぞれの面積/手作業で作成したGround Truth画像のスクラッチ領域面積の比を算出し、比較を行った。

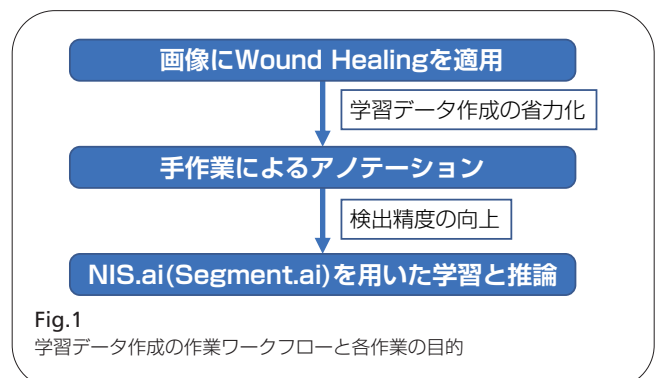


Fig.1

学習データ作成の作業ワークフローと各作業の目的

結果

NIS.aiは、スクラッチ領域の境界をWound Healingよりも正確に検出できることが示された (Fig.2 a-b)。また、長時間タイムラプス画像に対する推論と測定において、Wound Healingによる結果は数値の増減が激しいのに対し、NIS.aiによる結果はGround Truthによる結果と平均で99.69%一致しており、NIS.aiがスクラッチアッセイの定量化を高精度に行えることが確認できた (Fig.3 a-b)。Wound Healingによる結果が顕著な誤りを示しているタイムポイントにおいても、NIS.aiは正確に検出できることが確認できた (Fig.3 c-e)。

まとめ

NIS.aiによる画像処理の利点として下記が挙げられる。

- ・ 光毒性の影響のない非染色画像からセグメントが可能。
- ・ 少ない教師データから学習モデルの確立が可能。
- ・ 既存の画像処理よりも高精度なセグメントが可能。
- ・ 長時間タイムラプスなどの大量の画像に特に有効。
- ・ Wound Healingの併用で教師データ作成の省力化が可能。

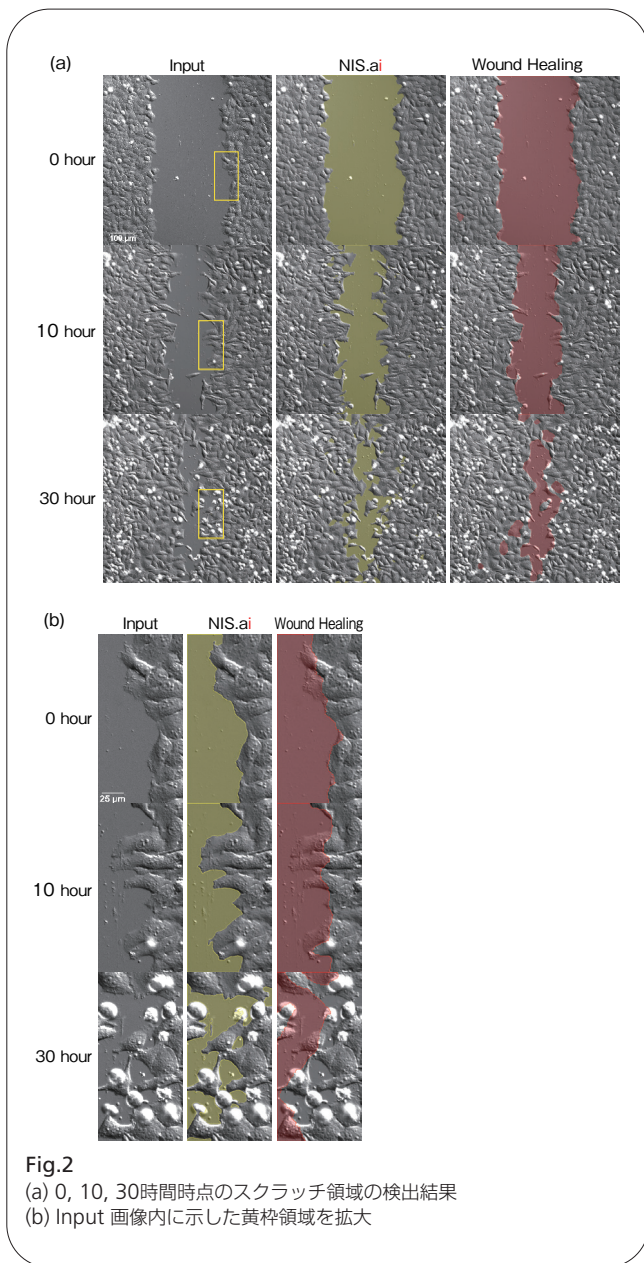


Fig.2

- (a) 0, 10, 30時間時点のスクラッチ領域の検出結果
(b) Input 画像内に示した黄枠領域を拡大

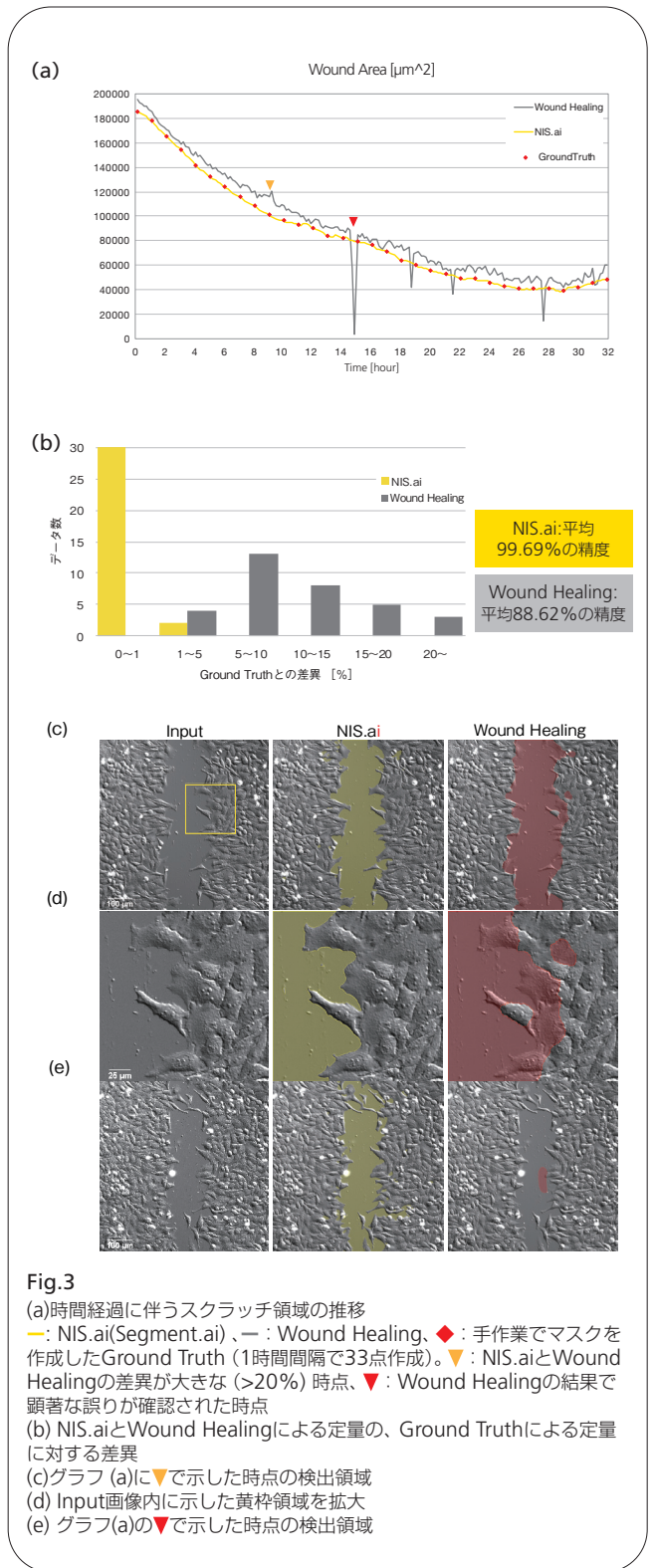


Fig.3

- (a) 時間経過に伴うスクラッチ領域の推移
—: NIS.ai(Segment.ai)、-: Wound Healing、◆: 手作業でマスクを作成したGround Truth (1時間間隔で33点作成)。▽: NIS.aiとWound Healingの差異が大き (>20%) 時点、▼: Wound Healingの結果で顕著な誤りが確認された時点
(b) NIS.aiとWound Healingによる定量の、Ground Truthによる定量に対する差異
(c) グラフ (a)に▽で示した時点の検出領域
(d) Input画像内に示した黄枠領域を拡大
(e) グラフ(a)の▼で示した時点の検出領域

製品情報

顕微鏡用AIモジュールNIS.ai (Segment.ai)

画像統合ソフトウェアNIS-ElementsのNIS.aiモジュールは、ディープラーニングを活用して教師データを学習することにより、画像処理や解析のワークフローを改善できます。NIS.aiのSegment.ai機能は、さまざまな形状の細胞が混在する微分干渉画像や位相差画像の中から、ターゲットとなる細胞のみを素早く抽出できるため、定量測定が可能です。