

# 顕微鏡用画像統合ソフトウェアにおける AI 技術紹介とライフサイエンス応用

門井宏平, 畑口剛之, 武居俊輔

## Introduction of AI Technology in Imaging Software for Microscopes and Life Science Applications

Kohei KADOI, Takeshi HATAGUCHI and Shunsuke TAKEI

ライフサイエンスの分野で Artificial Intelligence による画像処理の応用が広がりつつある。我々は、顕微鏡システム用の画像統合ソフトウェアである NIS-Elements に、Deep Learning を用いた画像処理技術である NIS.ai を搭載した。NIS.ai は NIS-Elements に統合することで、ユーザーが容易に先進的な Deep Learning 技術を利用することができる特徴を持ち、画像の生成や領域分割の実施が可能である。本稿では NIS.ai の活用により、正確な解析結果の取得とユーザーの作業負担低減が可能であることを紹介する。まず、非蛍光染色細胞の画像に対し NIS.ai を用いた解析が、蛍光染色細胞の画像を用いた従来の解析と同等の精度となることを確認した。次に、蛍光撮影において問題となる染色試薬による影響や蛍光撮影時に生じる光毒性を NIS.ai の活用により回避出来ることを実証した。最後に、NIS-Elements が制御する顕微鏡撮影手順に NIS.ai を組み込むことにより、従来の画像解析技術の利用では達成が困難であった自動撮影が可能となり、新たな価値を提供できることを示した。

The application of artificial intelligence in image processing is being investigated extensively in life sciences. We develop and install NIS.ai, an image processing technology that uses deep learning, in NIS-Elements, which is an imaging software for microscope systems. By integrating NIS.ai with NIS-Elements, NIS.ai enables users to use advanced deep learning technology easily with tasks such as image conversion, segmentation and so on. In this study, we show that users can obtain accurate analysis results with minimal effort using NIS.ai. First, we confirm that the analysis using NIS.ai for images of unstained cells exhibits the same accuracy as that of the conventional analysis for images of stained cells. Second, we demonstrate that the effects of staining reagents and the phototoxicity that occurs when capturing fluorescence images can be avoided by utilizing NIS.ai. Finally, we demonstrate that by incorporating NIS.ai into NIS-Elements, automatic imaging, which is difficult to achieve using conventional image analysis, can be achieved, and a new value can be obtained.

**Key words** ライフサイエンス, 顕微鏡, 画像処理, 人工知能, 深層学習  
life science, microscopy, image analysis, artificial intelligence, deep learning

### 1 はじめに

ライフサイエンスの分野において、生物顕微鏡を用いて細胞を観察する際、デジタル画像処理を行うことで、細胞のカウントや分類などの自動化が行われている。近年は、特に AI の一種である Deep Learning を用いた画像処理技術の検討が広がっており、領域分割、分類、デジタル染色、鮮明化、超解像などへの応用が報告されている [1]。

NIS-Elements は、顕微鏡やカメラの制御、画像処理、解析、レポート機能を備えた顕微鏡システム用の画像統合ソフトウェアである。ニコンは、これまでいくつかの Deep Learning を応用した顕微鏡画像処理機能を、この NIS-Elements に搭載してきた。本稿では、デジタル染色に利用可能な機能 (Convert.ai) と、領域分割に利用可能な機能

(Segment.ai) (以降、これらの機能を NIS.ai と記載する) の技術とそのライフサイエンスへの応用について紹介する。

### 2 Deep Learning を応用した顕微鏡画像処理機能

比較的単純な領域分割や鮮明化であれば、モルフォロジー変換などの画像処理技術や、ランダムフォレストなどの Deep Learning ではない機械学習技術を用いることもできる。しかし、これらの技術は画像フィルターの設計など個別の調整が必要で、処理結果の質を向上させるためには熟練した技術が必要である。

本稿で紹介する NIS.ai の二つの機能 (Convert.ai, Segment.ai) は、Deep Learning の一種である Convolutional Neural Network を用いており、学習用データを必要とする

supervised 型の学習を採用している。Deep Learning は、画像フィルターの設計にあたる作業は学習の中で自動的に行われるため、従来型の画像処理や、機械学習で必要だった熟練した技術は不要になる。また、学習に用いるデータや学習の繰り返し回数を増やすことで、より精度を向上できる特徴がある。

Deep Learning を利用する場合、通常は適用する問題に応じて Hyper Parameter と呼ばれるパラメーターを調整する必要がある。Hyper Parameter の調整は試行錯誤が必要で、一般的に手間と時間がかかる困難な作業であるが、NIS.ai は顕微鏡画像に最適化済みのネットワーク構造を用いているため、設定項目は少なく、Deep Learning に精通していなくても簡単に良好な結果が得られる。

Table 1 NIS.ai 学習時の設定項目

Convert.ai	Iterations
	Dynamic range adaptation (on/off)
Segment.ai	Iterations
	Dynamic range adaptation (on/off)
	Detect touching object (on/off)

Table 1 は NIS.ai の学習時の設定項目である。ここで、Iterations は、学習の繰り返し回数を指定するオプションである。適切な値は学習用データの量やばらつきに依存するが、通常は1,000程度の値で十分である。NVIDIA Quadro RTX 4000を利用し Iterations を1,000回に設定した場合の学習時間は、Convert.ai では約3時間半、Segment.ai では約4時間半、同環境で画素数1,600x1,600の画像での推論時間は1枚あたり1秒以下である。学習時間は長いですが、学習により一度作成した学習済みモデルは何度も利用可能で推論時間が短いことの方が重要なため、実用上の問題はない。Dynamic range adaptation は、学習用データに明るさのばらつきが少ない場合、Detect touching object は、Segment.ai で近接した対象物を高精度に分離したい場合に指定するオプションである。

NIS.ai による処理は、ユーザーが準備した学習用データを用いて学習済みモデルを作成する学習フェーズと、学習結果を利用して、対象データから目的の画像を出力する推論フェーズの二つのフェーズから成り立つ (Fig. 1)。

学習フェーズでは、ユーザーは変換の元画像と、教師となる Ground Truth 画像を準備する必要がある。NIS-Elements の画像取得機能は、位相差画像や蛍光画像などの複数チャネルの画像を取得できる。ユーザーは NIS-Elements を用いて取得した複数チャネルの画像をそのまま、もしくは、NIS-Elements の画像処理機能を用いて処理した結果の画像を学習用データとして利用できる。

推論フェーズでは、対象データを学習済みモデルで推論処理した後、その処理結果を NIS-Elements の画像処理機能

で後処理することや、カウントや追跡などの解析を行い、その結果をグラフとして出力したり、Excel にエクスポートしたりすることができる。

さらに、NIS-Elements の定型的な画像処理、解析処理の組み合わせを自動化する機能 (GA3) や、複雑な条件を指定した撮影から解析処理のフローを自動化する機能 (JOBS) を用いることにより、画像取得から解析までの一連の処理を自動化すること、さらには、解析結果によって処理を変更し、効率的な解析作業を行うことができる。NIS.ai は NIS-Elements に統合されていることから、単に顕微鏡画像に対する AI 処理を提供しているだけではなく、利便性が高く、自動化された高度な解析を可能にした。

以下の章では、このような特徴を持つ NIS.ai のライフサイエンスへの応用事例を紹介する。

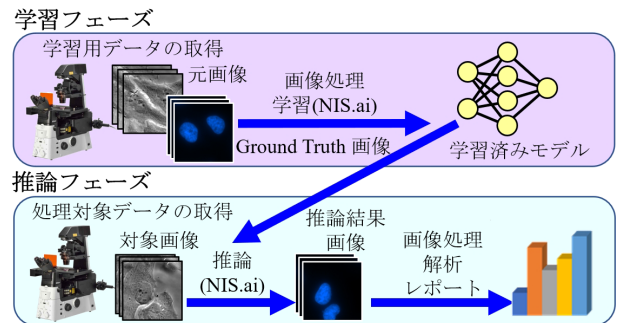


Fig. 1 学習、推論の処理フロー

### 3 ライフサイエンス分野への AI 応用事例

本稿では、NIS.ai を用いた以下の三つの事例を紹介する。

- 3.1. 非染色の顕微鏡画像を用いた高精度な蛍光画像生成
- 3.2. デジタル染色による染色試薬の影響回避
- 3.3. 顕微鏡撮影ワークフローの自動化

#### 3.1. 非染色の顕微鏡画像を用いた高精度な蛍光画像生成

生物学や医学系、創薬研究では組織や細胞内の特定の構造や分子を同定するためにサンプルを染色し、顕微鏡によりそれらを検出している。しかし、染色には試薬費用や煩雑な作業、染色結果のばらつきが生じる。さらに、臨床系の試験では、染色によりサンプルが再利用できなくなるため多数のサンプルを準備する必要がある。これに対し、デジタル染色と呼ばれる明視野等の非染色の顕微鏡画像から特定構造の染色画像を出力する Deep Learning の応用により、課題の解決が図られている。NIS.ai の Convert.ai は、このデジタル染色に応用可能な機能である。本章では、位相差顕微鏡法で取得した画像から細胞核の蛍光画像を生成した例を示す。

検証サンプルには、細胞核表面に局在する蛍光タグ付きタンパク質を恒常的に発現する BS-C-1細胞株を使用した。観察には倒立顕微鏡 Ti-E で20倍対物レンズ (CFI S Plan

Table 2 学習条件概要

	3.1節	3.2節	3.3節
使用サンプル	BS-C-1 細胞	HeLa 細胞	マウス腎臓切片
NIS.ai	Convert.ai		Segment.ai
画像学習	入力	位相差画像	明視野画像
	出力	細胞核蛍光画像	糸球体領域
画像サイズ	512 x 512 pixels		2048 x 2048 pixels
学習画像枚数	70	75	78
Iterations	1,000		

Fluor ELWD ADM 20XC 0.45NA, Nikon, Japan) を使用し, EMCCD (iXon3, Andor technology, Oxford Instruments, UK) で位相差画像と蛍光画像を取得した. 培養環境維持のためステージトップインキュベーター (STX series, Tokai Hit, Japan) により37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件で検証を進めた.

Convert.aiの学習には顕微鏡撮影時の細胞密度条件を20%から120%で振ったサンプル画像を用意し, Table 2 (3.1節の項) の条件で学習後, 学習用データとは別視野のタイムラプスにモデルを適用した. Convert.ai による推論精度は細胞核数の増殖曲線と F-score を用いて評価した. 増殖曲線はタイムラプスにおける同一視野の細胞核数の推移を示したグラフであり, NIS-Elements の既存の画像解析機能を用いて細胞核数を定量しプロットした. F-score は機械学習において推論精度を示す一般的な指標で, 1 に近いほど精度が高く, Ground Truth の蛍光画像における細胞核と Convert.ai の推論画像による細胞核の重心が, 10ピクセル以内に存在するか否かを基準に算出した.

その結果, Convert.ai により推論された細胞核の局在が Ground Truth 蛍光画像とほぼ同一の局在を示すことが確認された (Fig. 2, 白矢尻). さらに, 増殖曲線も蛍光画像を基にした Ground Truth による結果と非常に近い曲線を示し, 細胞密度が変化しても推論精度が維持されることが確認された (Fig. 3). 細胞密度毎に算出した F-score の値から, 80%までの細胞密度であれば, Convert.ai は0.90を超える高い推論精度となることも示された (Table 3). 細胞密度100%の近接した細胞間の見分けが難しくなる画像でも F-score 0.89と比較的精度良く実施可能であることが確認された.

上述の検証結果から, NIS.ai の Convert.ai 機能を用いることにより, 現実的な数の学習用データを用いた学習で, 非染色画像から高精度に細胞核を推論できると言える. NIS.ai の活用により, 蛍光顕微鏡で使用する蛍光波長帯も節約でき, 基礎研究分野における多色観察にも有用なツールとなる. さらに, 患者の疾患組織を由来とするような貴重なサンプルを解析対象とする臨床系研究での活用も期待される.

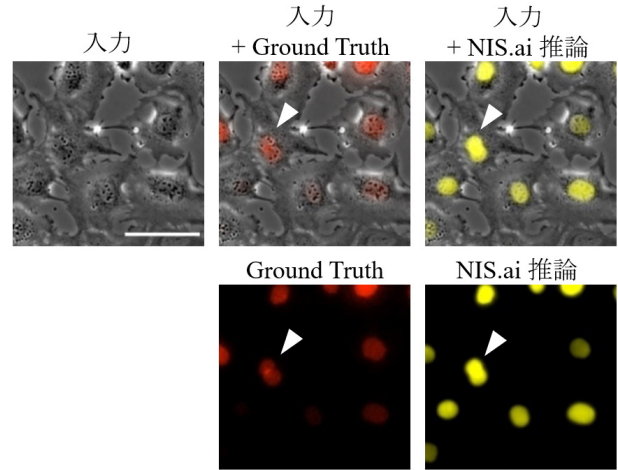


Fig. 2 細胞核蛍光の Ground Truth 画像と, NIS.ai による推論画像の比較

上段左から, NIS.aiへ入力した位相差画像, 入力画像と Ground Truth (赤), 入力画像と NIS.ai 推論 (黄) の蛍光画像の重ね合わせ, 下段は Ground Truth と NIS.ai 推論の細胞核蛍光画像を示している. 白矢尻は同一の細胞核を示している. スケールバーは 80 μm.

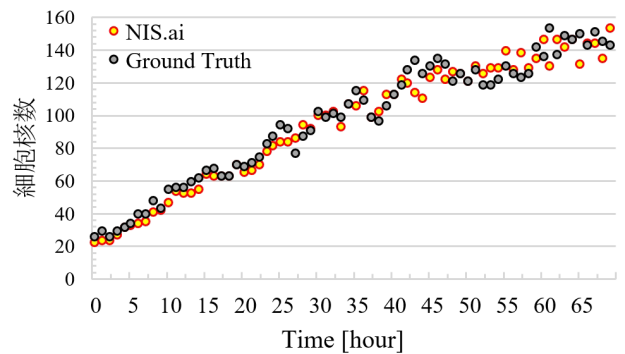


Fig. 3 細胞核蛍光の Ground Truth 画像と, NIS.ai による推論画像を用いた細胞核数の増殖曲線の比較

Table 3 NIS.ai による細胞核推論の精度

細胞密度 (%)	細胞核数					F-score
	Ground Truth	NIS.ai	True Positive	False Negative	False Positive	
30	24	22	22	2	0	0.96
50	65	63	62	3	1	0.97
80	73	69	67	6	2	0.94
100	101	99	89	12	10	0.89

### 3.2. デジタル染色による染色試薬の影響回避

サンプルの染色にはコストや手間, 実験者間の結果のばらつき以外にも課題がある. 染色試薬の添加や蛍光画像撮影のための照射光に起因する毒性 (光毒性) が細胞動態に影響を及ぼすことが知られているため, 試薬の使用や顕微鏡撮影には十分な条件検討が必須である. また, 細胞や組

織を生体へ戻すような再生医療分野では染色を伴う全数検査はできない課題がある。これらの課題を回避するため、NIS.aiによる蛍光デジタル染色を用いることが可能である。本章ではHoechstを用いた検証結果を紹介する。Hoechstは細胞核染色に広く使われる染色試薬であり、試薬での標識による毒性や光毒性を生じることが知られている [2]。

検証サンプルにはHeLa細胞を用い、顕微鏡撮影は3.1.章の検証と同様の装置構成と環境にて実施した。試薬の影響を検証するために二つの実験群を準備した。一つは撮影前にHoechstで細胞核を染色したサンプル（Hoechst実験群）、もう一方はNIS.ai学習済みモデルを適用する非染色のサンプル（非染色NIS.ai実験群）である。二つのサンプルをタイムラプス撮影し定量画像に利用した。また、非染色NIS.ai実験群の推論精度を評価するため、最後の撮影の直前にHoechst染色を行い、Ground Truth画像を取得した。NIS.aiの学習用データは別途、細胞密度条件を20%から120%で振ったサンプルをHoechstで染色し撮影した。これらの画像をConvert.aiを用いてTable 2（3.2節の項）の条件で学習し、入力した位相差画像から細胞核の蛍光画像を出力するモデルを作成した。Hoechst実験群、非染色NIS.ai実験群それぞれに対し細胞核を検出・定量化し、増殖曲線を作成した。

その結果、Hoechst実験群、非染色NIS.ai実験群で撮影開始時には同程度の密度の細胞が、Hoechst実験群では試薬や光毒性の影響により60時間経過後の細胞が非染色NIS.ai実験群と比較し少ないことが分かる（Fig. 4）。増殖曲線からもHoechst実験群の細胞増殖が抑制されたことが確認された（Fig. 5）。NIS.aiの推論精度に関してはタイムラプ

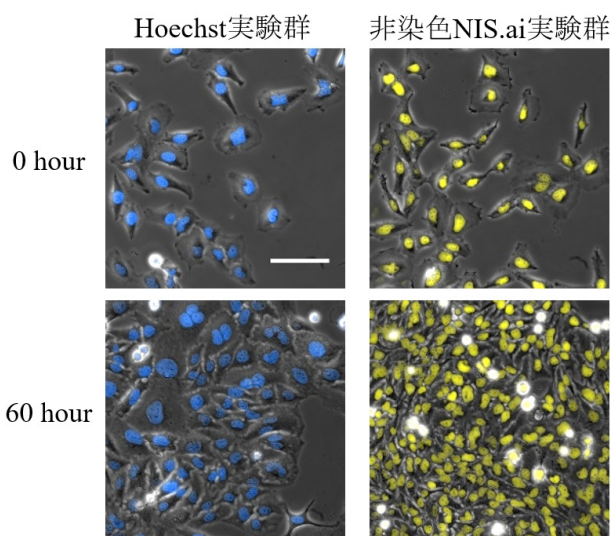


Fig. 4 撮影開始前にHoechstで染色した細胞（左列）と非染色の細胞（右列）の画像比較

左列はHoechstで染色された細胞核領域（青）、右列はNIS.aiにより推論された細胞核領域（黄）を示し、それぞれ位相差画像と重ね合わせている。同一視野の0、60時間時点の画像を上下に並べている。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

スの最終時点におけるGround Truth画像との比較により十分な推論精度が達成可能であることを示した（Fig. 5, 赤点）。

これらの結果から、NIS.aiを用いた蛍光デジタル染色により細胞本来の正しい挙動を捉えられることが示された。染色試薬による影響や光毒性に影響されず生体サンプルの挙動を正確に把握することは、生物学や医学、創薬の現場で今後も重要性が増すことが想定される。

### 3.3. 顕微鏡撮影ワークフローの自動化

従来の顕微鏡画像を用いた研究では、研究者は研究対象の代表的な顕微鏡画像のみを提示し、定性的な結果から議論されることが少なくなかった。しかし、近年、技術的な進歩により多量の画像取得、解析が可能になり、顕微鏡画像を定量的に評価することが必須となっている。そのため、病理組織切片のような大きなサンプルの撮影 [3] や、創薬研究で実施される大規模スクリーニング [4] では顕微鏡でのマニュアル撮影は大きな負担となる。例えば、腎臓の疾患の一つであるネフローゼ症候群では、糸球体に存在する細胞の細かい構造が欠失することが知られている [5]。このような形質の差異を検出するため、顕微鏡ユーザーは高倍対物レンズを用い、特定の構造の位置を一つ一つ目視で確認した上で撮影する必要があるため、撮影や解析作業にかかる負荷が非常に高い。そこで、NIS.aiによる領域分割をNIS-Elements上で撮影フローに組み込むことで、画像取得する領域を特定構造に絞り込み、顕微鏡撮影と解析に要するユーザーの負荷軽減が可能である。本章では、腎臓の切片サンプルから糸球体のみを自動検出し撮影する例を示す。

検証にはマウス由来の腎臓切片に対し、弾性線維や膠原線維などの結合組織を標識するエラスチカマッソン染色を

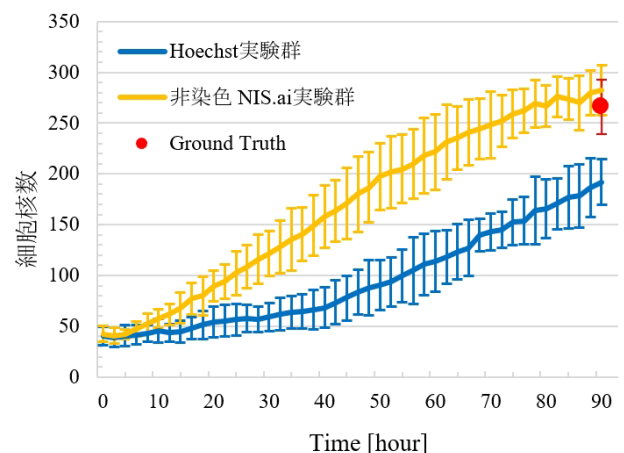


Fig. 5 撮影開始前にHoechstで染色した細胞（青）と非染色細胞のNIS.aiによる推論画像（黄）を用いた細胞核数の増殖曲線の比較

各時点で平均 $\pm$ SD ( $n = 3$ )を示している。非染色細胞は最終時点でHoechst染色し、Ground Truthとした（赤点）。

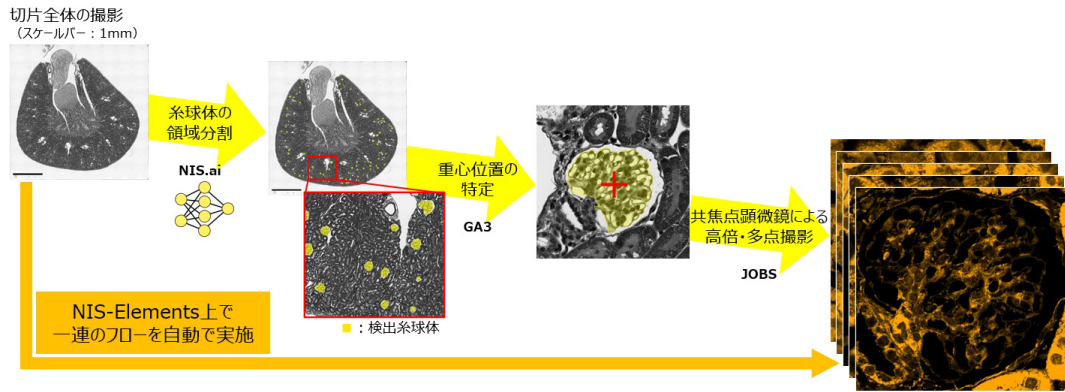


Fig. 6 腎臓糸球体の検出から撮影までの自動化ワークフローの全体像

行ったサンプルを使用した。撮影には共焦点顕微鏡システム A1R を備えた倒立顕微鏡 Ti2-E を使用した。糸球体の位置を検出するための画像取得には、20倍対物レンズ (CFI Plan Apo Lambda 20X 0.75NA, Nikon, Japan) と CMOS カメラ (ORCA-Fusion, Hamamatsu Photonics, Japan)、構造の詳細観察には100倍対物 (CFI SR HP Apo TIRF 100XC Oil 1.49NA, Nikon, Japan) と共焦点顕微鏡システムを用いた。学習用データは20倍対物レンズにより撮影した複数画像の繋ぎ合わせにより得られた腎臓切片全体像 (スライド2枚分) から切り出した78枚の画像に対して糸球体の領域を示す学習用データを作成し、Segment.ai 機能により明視野画像の入力から糸球体の領域を出力するモデルを構築した (Table 2, 3.3節の項)。

明視野画像取得から糸球体蛍光画像取得までを自動化するために構築した1) 明視野画像取得と繋ぎ合わせによる腎臓全体画像の構築 (20倍対物レンズ)、2) 糸球体領域の推論 (Segment.ai)、3) 糸球体の重心座標算出、4) 共焦点顕微鏡システムによる糸球体蛍光画像取得という工程から成り立つワークフローを Fig. 6 に示す。

結果、糸球体領域の検出に関して NIS.ai 処理単独では細かい誤検出は認められたが、GA3に面積や円形度によるフィルター処理を組込むことで糸球体のみが正確に検出された (Fig. 6, 赤枠)。さらに、手作業による糸球体検出結果と比較すると、NIS.ai 処理での False Negative/ Positive はそれぞれ 1%/7.2%に留まった (Table 4)。

以上より、既存の画像処理での検出が難しかった領域も NIS.ai により精度良く検出出来ることが示された。特に、False Negative の少なさは重要である。なぜならば、False Positive の場合は後から撮影画像の取捨選択ができるが、False Negative となった領域は再撮影が必要になるためである。特に臨床試験では検出したい領域 (例えば癌領域の検出等) の見逃しは致命的になる可能性がある。さらに、NIS-Elements と NIS.ai の併用により、サンプルを顕微鏡にセットし撮影を開始すれば、実験者が顕微鏡の前で拘束されずに多量の画像を取得できるため大幅な省力化が期待できる。今後は生物・医学・創薬分野で定量化を目的とした

Table 4 NIS.ai による糸球体検出数と推論精度

Ground Truth	NIS.ai	False Negative	False Positive
97	103	1 (1.0%)	7 (7.2%)

多量のデータ取得と解析が増加することが想定されるため、NIS.ai を活用した自動撮影、画像処理ワークフローの有用性が増すと考えられる。

## 4 まとめ

NIS.ai は高精度なデジタル染色や領域分割が可能であり、基礎研究や、臨床研究等の応用研究で有効である。また、本稿では取り上げていないが、NIS.ai は顕微鏡画像のノイズや焦点外の蛍光漏れ込みを除去する機能も提供している。これらの機能の組合せや今後の機能拡張により、顕微鏡だけでは実現できないデジタル処理画像や解析結果を提供することでユーザーに対して研究効率向上や新規知見の発見への貢献を目指す。

マウス腎臓切片サンプルをご提供下さいました、大阪大学医学系研究科 腎臓内科学教室の松井功助教に感謝の意を表します。

## 引用文献

- [1] C. Belthangady and L. A. Royer, "Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction," *Nature Methods*, vol. 16, pp. 1215-1225, 2019.
- [2] D. W. Siemann and P. C. Keng, "Cell cycle specific toxicity of the hoechst 33342 stain in untreated or irradiated murine tumor cells.," *Cancer Research*, vol. 46, pp. 3556-3559, 1986.
- [3] O. Zhanmu, X. Yang, H. Gong and X. Li, "Paraffin-embedding for large volume bio-tissue.," *Scientific Reports*, vol. 10:12639, 2020.
- [4] J. R. Lin, M. F. Sichani and P. K. Sorger, "Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput

cyclic immunofluorescence method.," *Nature Communications*, vol. 6:8390, 2015.

- [5] B. Zhu, A. Cao, J. Li, J. Young, J. Wong, S. Ashraf, A. Bierzynska, M. C. Menon, S. Hou, C. Sawyers, K. N. Campbell, M. A. Saleem, J. C. He, F. Hildebrandt, V. D.

Dagati, W. Peng and L. Kaufman, "Disruption of MAGI2-RapGEF2-Rap1 signaling contributes to podocyte dysfunction in congenital nephrotic syndrome caused by mutation in MAGI2.," *Kidney International*, vol. 96, pp. 642-655, 2019.

---

門井宏平 Kohei KADOI  
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部  
System Development Department  
Technology Solutions Sector  
Healthcare Business Unit

武居俊輔 Shunsuke TAKEI  
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部  
System Development Department  
Technology Solutions Sector  
Healthcare Business Unit

畑口剛之 Takeshi HATAGUCHI  
ヘルスケア事業部 技術統括部 設計部  
Designing Department  
Technology Solutions Sector  
Healthcare Business Unit



門井宏平  
Kohei KADOI