

無染色 X 線 μ CT における少数注釈での 密充填植物細胞のインスタンス分割

八木原 直樹^{1,a)} 内海 ゆづ子^{1,b)} 山内 大輔^{2,c)} 峰雪 芳宣^{2,d)} 唐原 一郎^{3,e)} 星野 真人^{4,f)}
上杉 健太郎^{4,g)} 鈴木 芳生^{5,h)} 竹内 晃久^{4,i)} 岩村 雅一^{1,j)}

概要

無染色 X 線マイクロ CT は植物組織を非破壊・細胞単位で撮像できるが、細胞壁が低コントラストで密充填のため、少ない注釈で各細胞を分割するのは難しい。本研究はこの少数注釈かつ境界不明瞭な設定に取り組む。細胞壁に依存しない flow 系モデルに部分ラベル・一貫性正則化・合成教師データを組み合わせ、少数注釈での分割に対応する。さらに、 μ CT 画像に細胞壁の情報がそもそも乏しく学習が難しいことを定量的に示す。

1. はじめに

植物の器官や組織は細胞を最小単位とし、各細胞の形状・空間配置が器官の形態を規定し、その機能とも関係する。したがって、形態発生の理解には、個々の細胞の 3 次元形態と空間位置の定量が重要である。しかし、3 次元ボリューム中の無数の細胞を手作業で分割することは労力が膨大で、インスタンス分割の自動化が必要となる。

染色した試料の蛍光顕微鏡や電子顕微鏡による観察像では細胞壁が明瞭に識別できる。一方、X 線マイクロ CT (μ CT) は無染色・非破壊で組織全体を撮れる反面、細胞壁のコントラストが極めて低く、細胞が密充填するため細胞同士の併合が起きやすい。図 1 に、無染色 μ CT の植物細胞の断面（左）と、各細胞を手動で分割した正解ラベル（右）を示す。この無染色で境界が低コントラスト、かつ

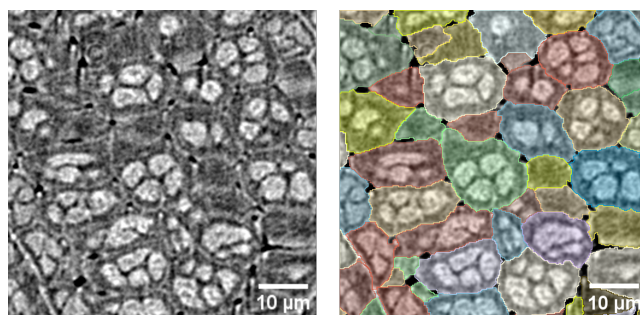


図 1 無染色 μ CT の植物細胞の断面（左）、その細胞インスタンス正解ラベル（右）。

細胞が 3 次元空間上で密である条件は、染色を前提とする手法 [1] や、境界が見える媒体での疎注釈学習 [2] とは異なり、既存手法の適用だけでは分割できない。さらに、大量の細胞を手で分割するのは非現実的なため、どれだけ少ない注釈でどこまで精度よく細胞をセグメンテーションできるかが中心的な問いとなる。

本研究の条件には二つの困難がある。第一に、細胞壁が学習しづらい。無染色 μ CT では細胞壁のコントラストが極めて低く、密充填で細胞どうしが接する。そのため、細胞壁の手がかりが画像に乏しく、境界が明瞭な顕微鏡画像向けの既存手法をそのまま適用しても精度は低い。第二に、少数注釈でインスタンス分割せねばならない。3 次元ボリュームの大量注釈は作業コストの面から非現実的で、断面内のごく少数に限られる教師データでドメイン適応し、大多数の未注釈細胞へインスタンス分割モデルを汎化させる必要がある。本研究は、これらの困難に対し、細胞壁を直接検出しない flow 系モデルを土台に据え、部分ラベルを活かす損失マスク学習で少数注釈を活用し、一貫性正則化と合成教師データで不足する教師を補うことで解決する。

本研究の貢献は三点である。第一に細胞表現のパラダイム（flow・形状・境界）を比較し、flow 系モデルを軸に少数注釈向けの工夫を組み合わせで精度を改善する。第二にその精度が頭打ちになるのは、手法ではなく画像にそもそも境界の情報が足りないためであることを定量的に示す。第三に無染色 μ CT の注釈付きベンチマークを構築する。

¹ 大阪公立大学大学院情報学研究科
² 兵庫県立大学大学院理工学研究科
³ 富山大学学術研究部理学系
⁴ 高輝度光科学研究センター
⁵ 東京大学大学院新領域創成科学研究科
a) sb26519e@st.omu.ac.jp
b) yuzuko@omu.ac.jp
c) dyamauch@sci.u-hyogo.ac.jp
d) mineyuki@gc4.so-net.ne.jp
e) karahara@sci.u-toyama.ac.jp
f) hoshino@spring8.or.jp
g) ueken@spring8.or.jp
h) yoshio2081@gmail.com
i) take@spring8.or.jp
j) masa.i@omu.ac.jp

2. 関連研究

本研究では、低コントラスト無染色 μ CT における細胞密充填組織で少数注釈から細胞インスタンス分割を行う。この観点から、分割手法のパラダイム、細胞分割モデルと μ CT への適用、少数注釈学習の三点を整理する。

2.1 細胞インスタンス分割のパラダイム

細胞インスタンス分割は、細胞の表現方法で三系統に分かれる。境界・画素ベースの U-Net[3] は watershed などの後処理で個体を切り出す。形状ベースの StarDist[4] とその 3 次元拡張 [5] は核を星状凸多角形として密集核でも安定に分離する。flow field を用いる Cellpose[6] は各画素から細胞中心へ向かうベクトル場を予測して同じ中心に収束する画素を一つの細胞とする。ただしこれらは細胞境界が明瞭な顕微鏡画像で発展しており、コントラストの乏しい無染色 μ CT でどの表現が有効かは明らかでない。本研究はこの三系統を μ CT 画像という共通条件下で比較する。

2.2 細胞インスタンス分割モデルと植物 μ CT への適用

細胞分割では、多様な細胞画像に再学習なしで適用できる Cellpose[6] が普及し、Cellpose 2.0[7] は少数注釈による微調整を可能にした。ただし主に染色顕微鏡画像で学習・評価されており、無染色・低コントラストや密充填組織での有効性はほとんど検証されていない。植物組織では細胞分割は共焦点蛍光画像が中心で、PlantSeg[8] は細胞境界を学習して分水嶺で個体化し、Kar ら [9] は共焦点データで 3 次元インスタンス分割アルゴリズムを横断的に比較した。一方、X 線 μ CT を対象とする研究は限られる。Van Doorselaer ら [1] は果実柔組織に Cellpose を再学習したが、正解作成は造影染色に依存し、空隙が少ないほど精度が低下することを示した。本研究は、正解作成も含め完全に無染色で、かつほぼ空隙のない密充填組織を扱う点で異なる。

2.3 少数注釈・半教師あり・疎注釈学習

注釈コストの削減はセグメンテーション研究に共通する課題である。半教師あり学習では Mean Teacher[10] 型の一貫性正則化が、疎注釈では点注釈からの核分割 [2] などが提案されてきた。ただし多くは境界が観測可能な媒体を前提とし、無染色 μ CT での有効性は明らかでない。

3. 提案手法

提案手法の全体像を図 2 に示す。土台は flow field ベースの Cellpose-SAM (以下 cpsam) [11] である。cpsam は未注釈細胞を含む断面全体を入力するが、図 2 (a) の損失マスクによる部分ラベル学習により、注釈した少数の細胞だけを教師として用いる。さらに、教師データの不足を補うため、図 2 (b) の注釈のない領域を活用する一貫性正

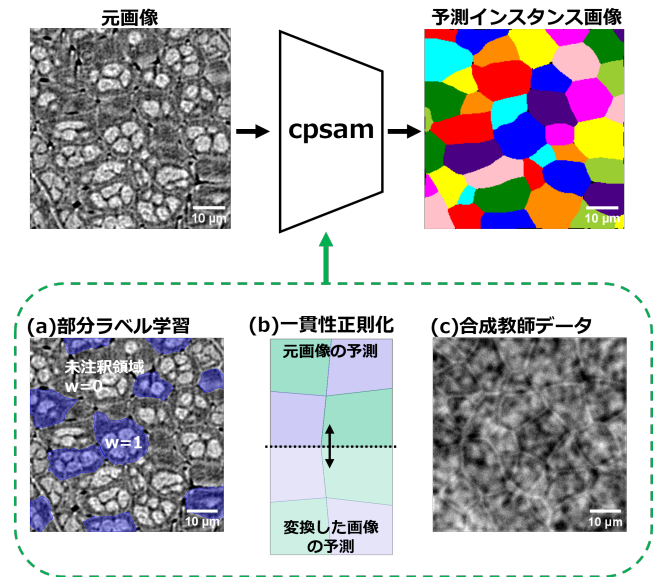


図 2 提案手法

則化と、図 2 (c) の合成教師データを組み合わせる。以下、各要素を順に述べる。

3.1 cpsam

土台には、flow field ベースの細胞インスタンス分割モデル cpsam を用いる。これは SAM の事前学習済みバックボーンを Cellpose の flow 予測に接続したものである。flow 表現は、各画素から所属細胞の中心へ向かう勾配を予測し、同じ中心に集まる画素を一つの細胞とする手法で、境界を画素単位で直接検出する必要がない。U-Net などの境界ベースの手法は細胞壁がはっきり見えないと分割できないが、cpsam は細胞壁を直接検出しないため、細胞壁が不明瞭でも分離できると期待される。

3.2 損失マスクによる部分ラベル学習

提案手法の中核は、図 2 (a) に示すように、断面内で数個だけに注釈を与えた部分ラベルを、未注釈の細胞を背景と誤認させずに学習することにある。ラベル細胞を外接矩形で切り出す crop-to-labeled は、断面全体とスケールがずれて周辺情報も失われ、パッチに写り込む未ラベルの隣接細胞を背景と誤学習してしまう。そこで本研究は、断面全体を入力としつつ、ラベルを与えた画素のみを教師、それ以外を損失計算から除外する。cpsam の損失は全画素平均で除外する画素を指定できないため、標準の学習関数を使わず、画素重み W を導入して損失を構成した。画素 p における損失を ℓ_p (flow field の二乗誤差と細胞確率の交差エントロピーの和)、重みを $W_p \in \{0, 1\}$ (ラベルを与えた細胞で 1、それ以外で 0) とすると、学習損失は

$$\mathcal{L} = \frac{\sum_p W_p \ell_p}{\sum_p W_p} \quad (1)$$

で与えられ、 $W_p = 1$ の画素のみで平均される。これで、周

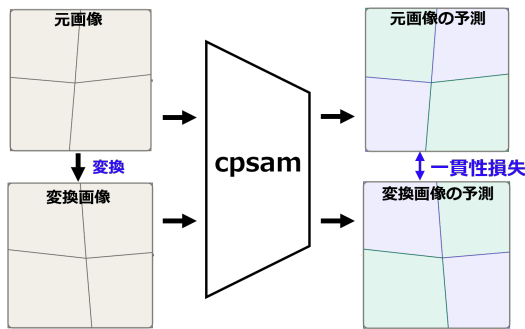


図 3 一貫性正則化

辺情報を壊さず未注釈細胞の背景化を避けて学習できる。

3.3 未注釈細胞を用いた一貫性正則化

断面内には、ラベルはないが画像としては観測できる細胞が多く残る。これを活用するため、入力への変換に対して予測が不変であることを課す一貫性正則化 (II-model[12]) を導入する。図 3 に示すように、反転や画素値変換を与えた入力の予測が変換前の予測と一致するよう、未注釈細胞上で損失を加える。変換前の予測を手本とし、変換した入力の予測をそれに近づけることで、注釈がなくとも自身の予測を手本に学習できる。本研究では、学習中のモデル自身に手本を作らせる II-model[12] 型を用いる。

3.4 較正済み合成教師データ

少数注釈を補うため、図 2 (c) に示す合成断面を教師データに混ぜる。細胞配置は 3 次元の重み付きボロノイ分割で空隙のない密充填構造を生成し、細胞壁と内部の強度は実データの境界プロフィールから与え、テクスチャとノイズを付与した。合成データでは正解が既知なので、人手注釈なしに密な flow field の教師データを供給できる。重要なのは、合成画像での細胞壁の見えやすさが実データと一致するよう較正することである。合成壁が鮮明すぎると実データに通用しないため、後述の方法で計測した実データの細胞壁の見えやすさに合わせる。較正した合成断面は、対象の断面ごとにその場で適応する学習に合わせ、事前学習ではなく注釈細胞の教師と交互に与えて用いる。

4. 実験

本実験では、注釈量を変えたときに未注釈細胞の分割精度がどう変化するかを評価する。1 枚の断面で k 個の細胞のみを正解として与え、残りの未注釈細胞をどこまで分割できるかを問う。注釈数 k を $k = 1, 5, 10, 20$ と増やし、注釈量と精度の関係を測る。最終的な目的は 3 次元形態の定量だが、3D ボリュームの直接注釈は労力が膨大なため、注釈の軽い 2D 断面で分割を学習し、予測を積層して 3 次元インスタンスを構成する。その際、単純な積層では同一細胞が断面ごとに分断されるため、隣接断面でインスタンス

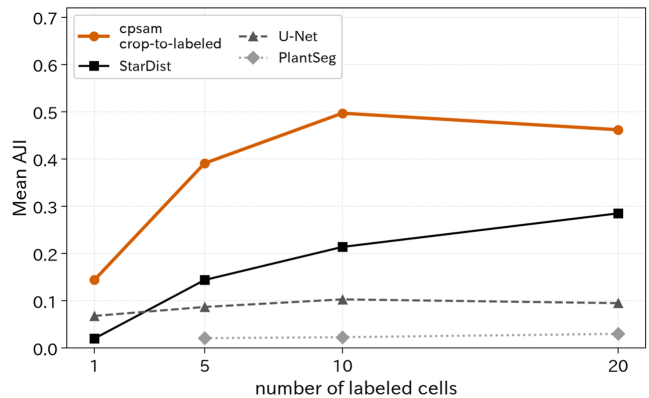


図 4 三系統手法比較

を対応づけて Z 方向の一貫性を保つ。

4.1 データセット

シロイヌナズナ種子を大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL20XU で撮像し、無染色 X 線 μ CT ボリュームを取得した。8 keV の単色 X 線により有効画素サイズ $0.2428 \mu\text{m}/\text{pixel}$ で撮像し、ラボ系 μ CT では無染色の軟組織に到達の難しい高分解能を実現している。このボリュームから $256 \times 256 \times 64$ ボクセルの領域を抜き出し、全細胞を無染色画像のみから 1 ボクセルずつ手作業で塗り分けて正解とした。実験では k 個の細胞のマスクのみを学習に与え、残りを評価に用いる。

4.2 評価指標

評価には Aggregated Jaccard Index (AJI) [13] を用いる。AJI はインスタンス単位で併合・分割・境界ずれをまとめて罰する指標である。正解インスタンス集合を $\{G_i\}_{i=1}^N$ 、予測インスタンス集合を $\{P_j\}$ とすると、各正解 G_i に最も Jaccard 係数の高い予測 $P_{j^*(i)}$ を対応づけ、AJI は次式で与えられる。

$$\text{AJI} = \frac{\sum_{i=1}^N |G_i \cap P_{j^*(i)}|}{\sum_{i=1}^N |G_i \cup P_{j^*(i)}| + \sum_{k \in U} |P_k|} \quad (2)$$

ここで U はいずれの正解にも対応づけられなかった予測の添字集合であり、分母に加えることで過分割を罰する。

5. 結果

5.1 パラダイム比較

図 4 に、三系統の代表手法を同一の少数注釈条件で比較した結果を示す。結果は明確な三層構造となり、flow 系 (cpsam_crop-to-labeled) が最良、形状系 (StarDist) が中位、境界系 (U-Net・PlantSeg) が最下位であった。特に PlantSeg は、細胞壁を予測して細胞を切り分ける手法だが、低コントラストのため細胞壁の予測がぼやけて位置を捉えられず、分割がほぼ成立せずに AJI 0.05 未満まで精度が低下した。この順位は表現が細胞壁の可視性にどれだ

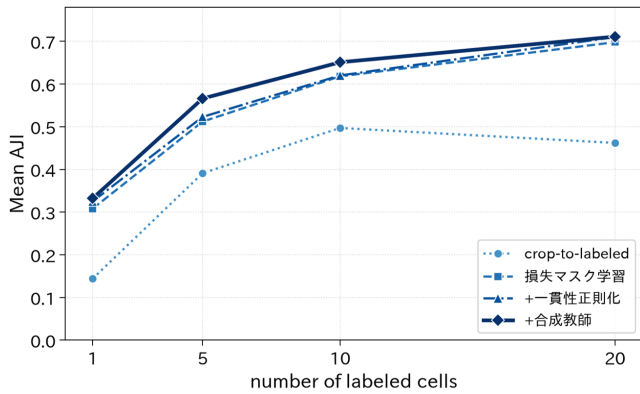


図 5 cpsam における注釈数に対する未注釈細胞の AJI。crop と損失マスク学習の比較、一貫性正則化・合成教師の寄与を示す

け依存するかと整合し、細胞壁を必要としない flow 系が本データで最も精度が高いことを示す。

5.2 提案手法の評価

cpsam における部分ラベルの与え方の効果を図 5 に示す。cpsam では、crop-to-labeled が $k = 20$ で AJI 0.46 程度に頭打ちなのに対し、損失マスク学習は 0.70 に達した。断面全体の文脈を保ち、学習に与えない細胞を背景化しないことが効いている。同じ傾向は StarDist でも見られ、損失マスク学習 ($k = 20$ で 0.430) が crop-to-labeled (0.285) を上回った。

同じ図 5 には、損失マスク学習を土台とした一貫性正則化と較正済み合成教師の寄与も示している。一貫性正則化は低注釈域 ($k = 1, 5$) で小さな改善を与え、較正済み合成教師はより大きく、 $k = 1$ で +0.038、 $k = 5$ で +0.058 と低注釈域の精度を改善した。注釈が少ないほど効果が大きく、 $k = 20$ では改善がほとんどみられない。 $k = 20$ では損失マスク学習のみで注釈から引き出せる情報がほぼ飽和し、補強の余地が小さいと考えられる。また両者の効果は加算的でなく、低注釈域を補う代替的な補強として働く。

6. 限界の分析

結果で観察された AJI 0.6–0.7 程度の頭打ちが、提案手法に改良の余地があるためか、画像そのものが細胞の分離に必要な情報を欠くためかを検討する。中心に置くのは、手法に依存せず情報量の上限を測るオラクル解析である。

最良手法の誤りを分解すると、約 60% は併合（隣接細胞の連結）と見落としに集中し、過分割はわずかであった。主な失敗は接触した細胞どうしを分離できず一つにつなげてしまうことにあり、後処理の調整では解消しにくい、細胞壁が画像に見えにくいことに起因する誤りと考えられる。

細胞壁が画像にどれだけ見えるかの目安として、細胞壁画素と内部画素を画像特徴から見分ける分類器の識別性能 (Area Under the Curve:AUC) を測った結果を図 6 に示す。画像の輝度のみでは AUC 0.50 で、明るさだけでは壁をほ

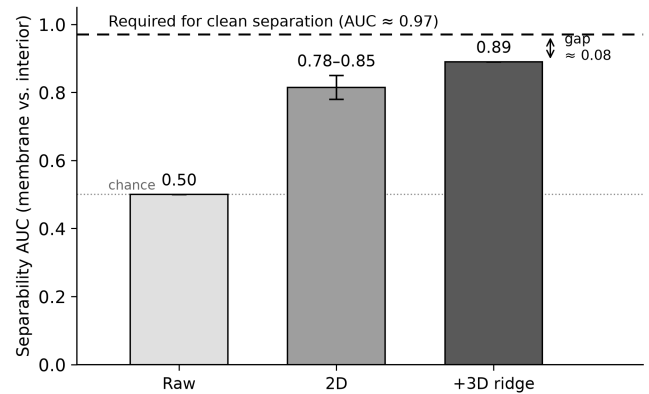


図 6 分類器の細胞壁識別性能の AUC

とんど区別できない。これは無染色 μ CT で染色が要るとされてきたことと整合する。2次元特徴で 0.78–0.85、3次元の稜線・面検出を加えて最大 0.89 まで上がるが、細胞の分離に必要と見積もられた 0.97 には届かなかった。ただしこの AUC は特定の特徴・分類器が引き出した値であり、より強いモデルでは上振れする余地がある。したがって、この識別性能は情報不足を示唆する傍証と位置づけ、判断は次のオラクル解析に委ねる。

各細胞の中心に seed を正解で与えて細胞の個数と位置を完璧にしても、AJI は 0.72 止まりだった。これにより、残る誤差は輪郭の配置に由来するはずで、実際、正しく当てた細胞に限っても IoU は平均 0.80 とずれていた。次にこのずれは、壁がぼけて埋もれているだけなのか調べた。これを確かめるため、ぼけ (点広がり関数) を仮定して Richardson-Lucy 法で復元し、壁の見えやすさを測り直したが、改善しなかった。このことから、細胞壁の情報は、ぼけて隠れているのではなく、もともと乏しいと分かった。正解の与え方を理想化しても精度がほとんど改善しないことは、分類器や手法の性能不足だけでなく、無染色 μ CT 画像が持つ境界情報の量そのものにも原因があることを示唆する。

7. まとめ

本研究では、無染色 X 線 μ CT で撮像したシロイヌナズナ種子の密充填組織を対象に、少数注釈での細胞インスタンス分割に取り組んだ。三系統の比較から flow 系 (cpsam) が最良と示し、損失マスク学習・一貫性正則化・較正済み合成教師により少数注釈での精度を改善した。一方で精度は頭打ちとなり、複数の解析から、これは手法の性能不足だけでなく、無染色 μ CT 画像の細胞壁情報の少なさに由来する限界と考えられる。

8. 謝辞

放射光実験は、JASRI の承認のもと (課題番号: 2014A1265)、SPRING-8 の BL20XU にて実施された。また、次世代 AI 人材育成プログラムの支援を受けた。

参考文献

- [1] L. Van Doorselaer, P. Verboven, and B. Nicolai, Automatic 3D cell segmentation of fruit parenchyma tissue from X-ray micro CT images using deep learning, *Plant Methods*, vol. 20, no. 1, art. 12, January 2024.
- [2] K. Tian, J. Zhang, H. Shen, K. Yan, P. Dong, J. Yao, S. Che, P. Luo, and X. Han, Weakly-supervised nucleus segmentation based on point annotations: A coarse-to-fine self-stimulated learning strategy, in *Proc. MICCAI*, pp. 299–308, October 2020.
- [3] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, U-Net: Convolutional networks for biomedical image segmentation, in *Proc. MICCAI*, pp. 234–241, October 2015.
- [4] U. Schmidt, M. Weigert, C. Broaddus, and G. Myers, Cell detection with star-convex polygons, in *Proc. MICCAI*, pp. 265–273, September 2018.
- [5] M. Weigert, U. Schmidt, R. Haase, K. Sugawara, and G. Myers, Star-convex polyhedra for 3D object detection and segmentation in microscopy, in *Proc. IEEE/CVF Winter Conf. Appl. Comput. Vis. (WACV)*, pp. 3666–3673, March 2020.
- [6] C. Stringer, T. Wang, M. Michaelos, and M. Pachitariu, Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation, *Nature Methods*, vol. 18, no. 1, pp. 100–106, January 2021.
- [7] M. Pachitariu and C. Stringer, Cellpose 2.0: how to train your own model, *Nature Methods*, vol. 19, no. 12, pp. 1634–1641, December 2022.
- [8] A. Wolny, L. Cerrone, A. Vijayan, R. Tofanelli, A. V. Barro, M. Louveaux, C. Wenzl, S. Strauss, D. Wilson-Sanchez, R. Lymbouridou, S. S. Steigleder, C. Pape, A. Bailoni, S. Duran-Nebreda, G. W. Bassel, J. U. Lohmann, M. Tsiantis, F. A. Hamprecht, K. Schneitz, A. Maizel, and A. Kreshuk, Accurate and versatile 3D segmentation of plant tissues at cellular resolution, *eLife*, vol. 9, art. e57613, July 2020.
- [9] A. Kar, M. Petit, Y. Refahi, G. Cerutti, C. Godin, and J. Traas, Benchmarking of deep learning algorithms for 3D instance segmentation of confocal image datasets, *PLoS Comput. Biol.*, vol. 18, no. 4, art. e1009879, April 2022.
- [10] A. Tarvainen and H. Valpola, Mean teachers are better role models: Weight-averaged consistency targets improve semi-supervised deep learning results, in *Proc. Adv. Neural Inf. Process. Syst. (NeurIPS)*, pp. 1195–1204, December 2017.
- [11] M. Pachitariu, M. Rariden, and C. Stringer, Cellpose-SAM: superhuman generalization for cellular segmentation, *bioRxiv*, 2025.04.28.651001, May 2025.
- [12] S. Laine and T. Aila, Temporal ensembling for semi-supervised learning, in *Proc. Int. Conf. Learn. Represent. (ICLR)*, April 2017.
- [13] N. Kumar, R. Verma, S. Sharma, S. Bhargava, A. Vahadane, and A. Sethi, A dataset and a technique for generalized nuclear segmentation for computational pathology, *IEEE Trans. Med. Imag.*, vol. 36, no. 7, pp. 1550–1560, July 2017.