

細胞分裂タイミングを使った胚の状態推定

西川 雅清[†] 澤田 好秀[‡] 加藤 弓子[‡] 向川 康博[†]

[†] 奈良先端科学技術大学院大学 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

[‡] パナソニック株式会社 〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-4

E-mail: [†] { nishikawa.masakiyo.nc9, mukaigawa } @is.naist.jp,

[‡] { sawada.yoshihide, kato.yumiko } @jp.panasonic.com

あらまし 体外受精において、培養後の胚が移植可能な状態に成長したか否かを判断する作業は必須であるが、この作業は医師にとって大きな負担となっている。そこで、胚の移植可能性判定の自動化に向けたファーストトライアルとして、胚の細胞数の時間幅を入力することにより胚が移植可能か否かを出力するモデルを機械学習によって構築し、移植可能性を推定できるか評価した。機械学習としてサポートベクターマシン(support vector machine, SVM)とニューラルネット(neural network, NN)の2種類を用いて、入力データ・学習パラメータを変更しながら実験した結果、最大 78.1%の識別率を得た。この結果から、胚の移植可能性判定自動化の実現可能性を示したといえる。加えて、NN 学習後の入力に対する結合荷重を可視化した結果、前核消失及び細胞数 3 個のときの時間が識別率への影響が大きいことを確認した。

キーワード 胚, 移植可能性推定, サポートベクターマシン, ニューラルネットワーク

Embryonic State Estimation using a Cell Division Timing

Masakiyo NISHIKAWA[†] Yoshihide SAWADA[‡] Yumiko O. KATO[‡] Yasuhiro MUKAIGAWA[†]

[†] Nara Institute of Science and Technology 8916-5 Takayama-cho, Ikoma-shi, Nara, 630-0192 Japan

[‡] Panasonic Corporation 3-4 Hikaridai, Seika-cho, Souraku-gun, Kyoto, 619-0237 Japan

E-mail: [†] { nishikawa.masakiyo.nc9, mukaigawa } @is.naist.jp,

[‡] { sawada.yoshihide, kato.yumiko } @jp.panasonic.com

Abstract Confirmation works which check whether the embryo can transplant are necessary in in-vitro fertilization but this works impose a burden on a medical doctor. So we try the embryonic state estimation by machine learning as the first trial for the automation of the confirmation. We build models which output the possibility of the transplant using cell division timing and evaluate the performance of the models. We make evaluation experiments by changing machine learning (support vector machine, SVM and neural network, NN) and parameters of model. As a result of experiments, a max identification rate is 78.1%. In addition, we found that the information of pronucleus of embryo disappearance and number of the blastomeres 3 is important for embryonic state estimation by visualizing the NN synapse combined load.

Keywords Embryo, Transplantability Estimation, Support Vector Machine, Neural Network

1. はじめに

体外受精における受精卵（胚）は、受精後数日間培養した後、患者に移植される。この過程において、胚の生育に問題があり、移植に適した状態にならない場合がある。胚が移植可能な状態に成長したか否かは専門家（医師、胚培養士）が判断している。胚を培養する際には恒温器（インキュベーター）に保管し、観察の際に逐次取り出して1つずつ専門家が顕微鏡下で観察している。

患者1人あたり約10個の胚を3日から5日程度の

期間培養するが、これまで、培養結果である胚の最終状態を観察して移植可能か否かを判断するのが基本であり、培養の途中経過の情報は判断にほとんど使われてこなかった。現在、着床率、妊娠成功率の向上を目的として、培養中の成長過程を考慮に入れた胚の選択の検討がなされている。

近年、恒温器内に設置可能な顕微鏡撮影機材が導入されつつあり、胚の情報を定期的に取得し続けることが可能になっている[2]。このような微速度撮影結果はタイムラプスと呼ばれている。タイムラプスの導入に

より、細胞分裂のタイミングなどの培養過程での状態が胚の生育の良否に影響していることが確認されている[2]。しかし、専門家が胚の成長を逐次観察し、評価し続けることは大きな負担となり、現実的ではない。そのため、多くの病院では、タイムラプスを充分に活用できておらず、多くの画像は死蔵されている。活用したとしても、前述したように専門家は多くの胚を判定しなければならず、精査することが困難である。これらは放射線科医等に起きている現象と同様であるため、「画像の洪水」[12][13]と呼ぶことができる。

加えて、人工授精による誕生が増加（2014年統計で、日本で新生児21人につき1人）しており、今後も増加が見込まれているため、専門家の負担は一層増加すると考えられる。そのため、胚の良否判断の手助けとなるような計算機システムの需要が存在する。

そこで、本稿では、新たに取得可能となった胚の情報を活用した、胚の成長状態の判断を手助けするシステムの開発に取り組む。胚に関する各種情報から自動で胚の移植可能性を推定するモデルを構築し、識別率について評価する。

岩端ら[3]、Kirkegaardら[4]は、タイムラプスによって明らかになった胚の生育過程が、その後の生育結果に及ぼす影響について検討している。本稿では、第3章に示す胚の成長時における、細胞数毎の時間幅に着目し、移植可能性を評価する。Kirkegaardらは、この時間幅と胚の生育の良否との関連を示唆しており、特に細胞数が3個のときの時間幅の影響を指摘している[4]。この特徴を用いて識別器を構築することで、移植可能性の判定の自動化を試みる。加えて、前核と呼ばれる核が表示されている時間の影響も示唆されている[3]。本稿においても、識別器の重みの値を可視化することで、これらの時間幅が有益であることが確認できたので、併せて報告する。

2. 専門家による胚の移植可能性評価

胚は受精卵としての1つの細胞から、細胞分裂を繰り返し生育する。初期の2細胞期、4細胞期、8細胞期では胚内の細胞の密着の度合いは小さく、細胞1つ1つが観察可能である。この期間を分割期と呼ぶ。その後、さらに細胞数が増加すると細胞同士の凝縮が起こり、1つ1つの細胞を観察するのは困難になる。このような状態を桑実胚と呼ぶ。さらには胎盤になる細胞群と胎児になる細胞群とへ細胞の集団ができる胚盤胞に成長する。上記の生育過程に対して、分割期と胚盤胞に対して、グレードと呼ばれる評価指標[9]にしたがって、専門家が胚の生育状態を判断する。

分割期のグレードは、観察した胚内部の細胞(割球)の状態に対して「細胞に張りがあるか」、「分裂した細胞

の大きさは均等か」、「細かな細胞の破片（フラグメント）が少ないか」などの評価項目があり、これによってG1～G5のグレードに分類される。このうちG1～G3は状態が良く、移植可能である可能性が高い。一方、G4、G5は状態が悪く、移植対象とならない。

胚盤胞については、成長過程別にBL1からBL5（もしくはBL6）まで分類される。その各段階において、内細胞塊（胎児の本体となる細胞群）と栄養外胚葉（胎盤となる細胞群）それぞれに対して、状態が良いもの（細胞数が多いもの）から順にA、B、Cのグレードがつけられる。

本稿では、モデル構築に用いる入力の前解データとして、前述の専門家によって付けられたグレードを利用する。構築するモデルは移植可能か移植不可能かの2種類のカテゴリのうちいずれかを出力する。移植可能性を、グレード等を利用して回帰的に求めることも可能であるが、グレード毎の十分な学習データの収集が困難であったため、本稿では2クラス識別を実施した。分割期におけるG1からG3、桑実胚、胚盤胞における内細胞塊の状態がAまたはB、栄養外胚葉の状態がA、B、Cに該当する胚を移植可能とする。逆に、初期胚におけるG4、G5、胚盤胞での内細胞塊の状態がCの胚および、変性や細胞分裂しないなどの特殊な状態になった胚は移植不可能とする。胚のグレードと移植可能性の対応をまとめた表を表1に示す。

表1 グレードと移植可能性の対応

	移植可能	移植不可能
分割期	G1, G2, G3	G4, G5
桑実胚	全て	なし
胚盤胞	内細胞塊 A, B, 栄養外胚葉 A, B, C	内細胞塊 C
その他	なし	変性, 細胞分裂しない

3. 学習データ

本章では、胚の移植可能性推定に用いる情報について述べる。

3.1. 細胞分裂タイミング

第1章で述べたように、最終的な胚の状態に、初期の細胞分裂が大きく影響している可能性が指摘されている[2][3][4]。そこで本稿では、細胞分裂のタイミングを識別に用いる。

細胞どうしが凝縮を起こす以前の、特定の細胞数である時間を細胞分裂タイミングと定義する。細胞分裂タイミングを表した図（参考文献[11]の図を元に著者

が手を加え作成した) を図 1 に示す。



図 1 細胞分裂タイミング

具体的には図 1 に示すように、胚観察開始から 1 回目の細胞分裂 (細胞数が 2 個になるタイミング) までの時間を「細胞数 1 の時間」、細胞数が 2 個になったタイミングから細胞数が 3 個になるタイミングまでの時間を「細胞数 2 の時間」というように、細胞数が 1, 2, 3, 4 までの各時間と、5 以上 8 未満の時間を計測し、学習データとして利用する。

3.2. 前核消失

細胞分裂のタイミングと同様に、胚の成長過程である前核消失という現象が最終的な状態に影響を及ぼしているといわれている [3]。前核消失を表した図 (参考文献 [11] の図を元に著者が手を加え作成した) を図 2 に示す。

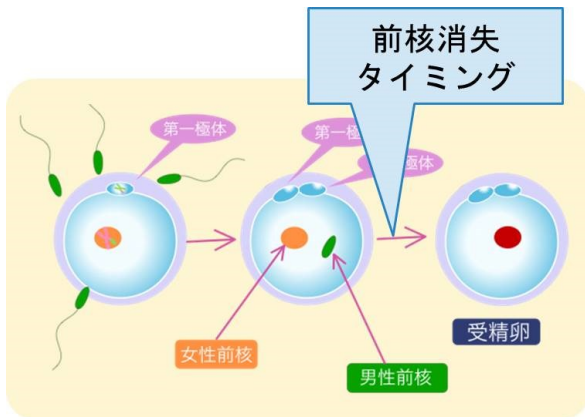


図 2 前核消失

胚は、受精直後は卵の核と精子の核の 2 つの核が存在している。この受精卵の成長が進むと、2 つの核が見えなくなり、核が 1 つとなるタイミングがある。これが前核消失である。

前核消失タイミングを考慮した細胞分裂タイミングデータでは、細胞数 1 の時間を前核消失前後に分割する。すなわち、前核有、なし、及び細胞数が、2, 3,

4 の時間、そして 5 以上 8 未満の時間が識別器に入力される。

4. 識別器

本章では、識別器として利用したサポートベクターマシン (support vector machine, SVM) とニューラルネットワーク (neural network, NN) について述べる。

4.1. SVM

SVM とは、クラス識別に用いる機械学習モデルの 1 つである。与えられた入力に対して、クラスを分類するような識別面を求める。識別面は、各データとの距離が最大となるような基準であるマージン最大化を使って学習する。

m 個の学習データを $(\mathbf{x}_1, y_1), \dots, (\mathbf{x}_m, y_m)$ とする。このとき $\mathbf{x}$ は n 次元の特徴ベクトルであり、 y は正解ラベル (+1 あるいは -1) である。SVM では、以下の式を満たす荷重 $\mathbf{w}$ を求めることでマージン最大化問題を解く。

$$\min_{\mathbf{w}} \frac{1}{2} \|\mathbf{w}\|^2 + C \sum_{i=1}^m \xi_i \quad (1)$$

$$y_i(\mathbf{w}^T \mathbf{x}_i + b) \geq 1 - \xi_i \quad (i = 1 \dots m) \quad (2)$$

式 (1) における C はコストパラメータ、 ξ はペナルティとなるスラック変数である。データが正しく識別され、マージン境界を含む外側にある場合は $\xi = 0$ 、マージン内では $0 < \xi \leq 1$ 、誤識別されたデータは $\xi > 1$ となる。 C が大きいほど誤識別に対して厳しくなる。

SVM はカーネルトリック [8] を利用することで非線形へ拡張することができる。本稿では、以下に示す RBF カーネルを利用した。

$$K(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \exp(-\gamma \|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j\|^2) \quad (3)$$

4.2. NN

NN とは、人の脳を模した学習器である。NN は多数のユニットで構成されており、入力層、中間層、出力層のように層構造を持っている。各層間のユニット同士は荷重で結合されている。

中間層が多数存在する NN では、低階層のパラメータが更新されない勾配消滅問題が存在する。これを解決するため、本稿では、各層ごとに教師なし学習を用いてプレトレーニングを行う [5]。その後、NN 全体に対して教師あり学習によるファインチューニングを行

う．

本稿でのプレトレーニングでは，オートエンコーダを拡張した Denoising Autoencoder を用いる[5]．入力を $\mathbf{x}$ としたときのエンコードとデコードの式は以下のようになる．

$$\text{encode: } \mathbf{y} = \mathbf{s}(\mathbf{W}\mathbf{x} + \mathbf{b}) \quad (4)$$

$$\text{decode: } \mathbf{z} = \mathbf{s}(\mathbf{W}'\mathbf{y} + \mathbf{b}') \quad (5)$$

$\mathbf{s}$ はシグモイド関数を表し， $\mathbf{W}$ ， $\mathbf{b}$ と $\mathbf{W}'$ ， $\mathbf{b}'$ が学習で求めるパラメータである． m 個の入力を $\mathbf{x}_k$ としたときの損失関数は次の式 (6) となる．

$$L(\mathbf{x}, \mathbf{z}) = - \sum_{k=1}^m [\mathbf{x}_k \log \mathbf{z}_k + (1 - \mathbf{x}_k) \log(1 - \mathbf{z}_k)] \quad (6)$$

また，正解パターンであるニューロン y の出力を a_y^L としたとき，ファインチューニング時のコスト関数は次の式 (7) である．

$$C \equiv -\ln a_y^L \quad (7)$$

活性化関数には，次の式 (8) で表される softmax 関数を用いる． z_j^L はニューロン j への入力の合計， a_j^L は j の出力である．

$$a_j^L = \frac{\exp(z_j^L)}{\sum_k \exp(z_k^L)} \quad (8)$$

5. 実験

本章では，入力データ，実験方法，評価方法，実験結果について述べる．

出力カテゴリは胚が移植可能か移植不可能かの 2 カテゴリである．実験に利用したデータは，移植可能な胚が 196 サンプル，移植不可能な胚が 87 サンプルであり，合計 283 サンプルであった．また，サンプルには細胞分裂が途中で停止した胚や変性が確認された胚が含まれている．これらのサンプルでは，入力データである細胞分裂タイミングの一部に欠損が生じることがあるが，欠損した「特定の細胞数である時間」の時間幅を 0 として利用した．

また，識別器構築においては，入力データの正規化が識別精度の向上に有効であるといわれている．そこで本稿では，前核消失有無に加え，入力データに対して正規化を行った場合，行わなかった場合との比較

も行った．すなわち，計 4 種類のデータセットに対して，SVM と NN のそれぞれで識別率を評価した．実験結果の評価方法は 10 分割の交差検証とする．

実験の手順について説明する．まず SVM を用いてモデルを構築する．SVM として LIBSVM[6]を用いた．このモデルに対して，4 つのデータセット（前核消失情報を用いた場合と用いない場合，正規化した場合と正規化しない場合）を用いた 4 種類の実験を実施する．その結果，高い識別率が得られたデータセットに対して，NN のパラメータを種々に変更しながら構築したモデルによる識別実験を実施する．NN には pylearn2[7]を用いた．

5.1. SVM を用いたモデルでの識別結果

SVM を用いて構築したモデルによる識別率を表 2 に示す．

表 2 SVM を用いたモデルの識別率 [%]

入力データの 正規化	前核消失情報	
	あり (6 次元)	なし (5 次元)
あり	78.1	76.7
なし	69.3	69.3

表 2 では，式 (1) 中のコストパラメータ C ，式 (2) の RBF カーネルのパラメータ γ について調整を行い，識別率が最も高かった結果を示している．前核消失情報ありの場合は $C = 500$ ， $\gamma = 0.2$ ，前核消失情報なしの場合は $C = 7000$ ， $\gamma = 0.3$ であった．

実験の結果，前核消失情報あり (6 次元) に正規化を施したデータセットにおいて 78.1% という最も高い識別率が得られた．この結果から，入力データを正規化することで識別率が向上することがわかった．さらに，前核消失情報を用いることで識別率が向上することがわかった．このことから，前核消失情報が胚の成長状態に関連しており，移植可能性推定に有用であると考えられる．

また，正規化ありの前核消失情報を含んだデータセットに対して，SVM による線形識別を適用したところ，73.9% の識別率であった．これは，今回の実験において入力データが 6 次元と少ないためであると考えられる．

5.2. NN を用いたモデルでの識別結果

次に，NN を用いた実験結果について説明する．前節で示したように，SVM を用いた実験結果から，正規化ありの前核消失情報を含んだデータセットが識別に有用であると考えられる．そのため，このデータセットを用いて識別を行った．

本稿では、中間層の数を 1 から 3 へと変更し、また、各中間層のユニット数も 5, 10, 50 と変更して識別率を評価した。加えて、学習率を 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 と変更して識別結果を評価した。結果を表 3 に示す。なお、表 3 では、各中間層の数、各ユニット数において学習率を変更したとき、識別率が最も高かった結果を示している。

表 3 NN を用いたモデルの識別率[%]

ユニット数	中間層の数（深さ）		
	1	2	3
5	74.2	74.2	72.9
10	75.9	74.2	74.2
50	74.9	75.7	73.5

実験の結果、中間層の数（深さ）が 1、ユニット数が 10 の場合に最も高い識別率 75.9%を得た。このとき、学習率は 0.1 であった。この結果は、入力に用いたデータの次元数及びデータ数が少ないためであると考ええる。

5.3. 識別に重要な情報の分析

移植可能性の推定に重要な情報（入力データ）の分析のため、NN での各入力の出力に対する寄与度である結合荷重の可視化を行った。各入力に対応する入力層のユニットごとに、中間層の各ユニットへの結合荷重の絶対値の平均値を求め、結合荷重の値とした。その結果を図 3 に示す。

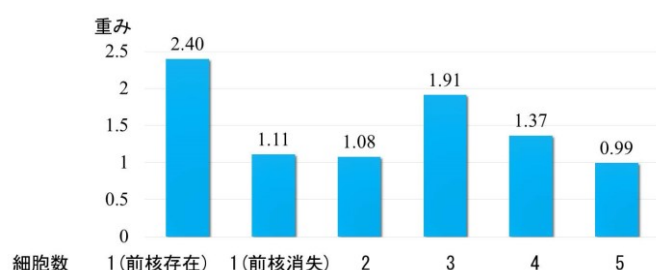


図 3 各入力に対する NN の結合荷重

図 3 から、最も結合荷重が大きかった情報は前核が存在していた時間である。続いて大きかったのは細胞（割球）の数が 3 個の時間であった。

この結果から、NN が前核情報と細胞数 3 のときの時間幅を特に重要視していることがわかる。この結果は岩端ら[3]、Kirkegaard ら[4]の結果と一致する。本稿で構築した NN はこれまでの知見に沿う判断基準で識

別を行ったといえる。ただし、本稿で構築した NN は中間層が 1 層のみであり、学習データ数を増加させ、中間層の数を増やしたときに同一の結果になるとは限らない。学習データの増加を踏まえた追考察は今後の課題とする。

6. おわりに

本稿では胚の移植可能性推定自動化に向けて、培養中の胚の成長過程である細胞分裂タイミングの情報から、胚が移植可能か否かを推定するモデルを構築した。そして、構築したモデルの識別率を性能評価実験により明らかにするとともに、識別に重要な入力データについても分析した。

SVM を用いたモデルに対する識別率評価実験の結果、前核消失情報ありで入力データを正規化したデータセットを用いた場合に最大 78.1%の識別率を得た。このことから、胚の移植可能性推定において前核消失情報が有効であると考えられる。また、正規化処理を施すことで識別率の向上に寄与することも確認した。

次に、NN を用いたモデルに対する識別率評価実験を実施した。NN のパラメータを変更しながら実験を行った結果、中間層の数（深さ）が 1、ユニット数が 10、学習率が 0.1 の場合に最も高い識別率 75.9%を得た。

また、NN の入力データに対する結合荷重の可視化により、前核消失情報と細胞数 3 の情報が識別に重要であることがわかった。この結果は、これまでの知見に沿うものであった。

本実験により、識別率最大で 78.1%と胚の移植可能性推定自動化の実現性を示す結果が得られた。しかしながら、実用化に向けては十分な識別率とは言い難い。そのため、今後の課題として、識別率の向上が挙げられる。その方法として、入力データの種類の増加や胚を撮影した画像そのものを入力としたモデルの構築が考えられる。これらはいずれも入力データの次元数増加をまねくため、効果的な学習のためには入力データのサンプル数増加が必要となる。

7. 謝辞

貴重なデータを御提供いただきました医療法人三慧会 IVF なんばクリニックの橋本周氏と中野達也氏に感謝いたします。

文 献

- [1] Fernando J. Prados, Sophie Debrock, Josephine G. Lemmen, and Inge Agerholm, “The cleavage stage embryo,” Human Reproduction, Vol.27, No.S1 pp.i50- i71, 2012.

- [2] Kyoko Iwata, Keitaro Yumoto, Minako Sugishima, Chizuru Mizoguchi, Yoshiteru Kai, Yumiko Iba, Yasuyuki Mio, "Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography," J Assist Reprod Genet, 31, pp.421-426, 2014.
- [3] 岩端秀之, 橋本周, 中野達也, 関藤孝昭, 井上朋子, 伊藤啓二郎, 中岡義晴, 鈴木直, 森本義晴, "ヒト胚の第一卵割の時間と発育能との関連," 日本受精着床学会雑誌, 32(1), pp.36-39, 2015.
- [4] K.Kirkegaard, U.S.Kesmodel, J.J.Hindkjær, and H.J.Ingerslev, "Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study," Human Reproduction, Vol.28, No.10, pp.2643-2651, 2013.
- [5] Pascal Vincent, Hugo Larochelle, Isabelle Lajoie, Yoshua Bengio, and Pierre-Antoine Manzagol, "Stacked denoising autoencoders: Learning useful representations in a deep network with a local denoising criterion," Journal of Machine Learning Research 11, pp.3371-3408, 2010.
- [6] Chang, Chih-Chung, and Chih-Jen Lin, "LIBSVM: a library for support vector machines," 2013.
- [7] Ian J. Goodfellow, David Warde-Farley, Pascal Lamblin, Vincent Dumoulin, Mehdi Mirza, Razvan Pascanu, James Bergstra, Frédéric Bastien, and Yoshua Bengio, "Pylearn2: a machine learning research library," 2013.
- [8] Christopher M Bishop, "Pattern recognition and machine learning," 2006.
- [9] IVF なんばクリニック, "診療内容について," <<http://www.ivfnamba.com/shinryo/baiyouroom.html>> (参照 2016-12-12).
- [10] 小林一郎, "人工知能の基礎," サイエンス社, pp.138-146, 2011.
- [11] "産婦人科の基礎知識," (2015) <<http://www.san-kiso.com/>> (参照 2016-12-11) .
- [12] 小畑秀文, "医用画像の計算機支援診断技術の現状と動向," 医用画像情報学会雑誌, Vol.21, No.1, pp.11-18, 2004.
- [13] 目加田慶人, "特集／画像とのインタラクションに基づく CAD 一序文ー," Medical Imaging Technology, Vol. 24, No.2, pp.73-74, 2006.
- [14] Michael Nielsen, "Neural Networks and Deep Learning," <<http://neuralnetworksanddeeplearning.com/index.html>>, 2016, (参照 2016-12-19).