

Sapphire アプリマニュアル

はじめに

遺伝子研究においては、世代交代に要する時間や飼育の容易さ、遺伝子情報の既知性などから、ショウジョウバエがモデル生物として頻繁に用いられています。主に、導入した遺伝子やその操作の影響が、ショウジョウバエ各個体のライフイベント（孵化・蛹化・羽化・生命活動停止、など）に及ぼす影響が調べられていますが、多個体同時飼育されたショウジョウバエ集団におけるライフイベント転換点を、個体ごとに検出するには、現在目視による作業となっており、これには膨大な人的・時間的コストを伴います。

そのため、多個体同時飼育下におけるショウジョウバエ集団のタイムラプス画像から、各個体ごとの全ライフステージ転換点を自動検出するアルゴリズムを提供し、その結果を可視化するとともに、ユーザーフレンドリーな可視化カスタマイズや、精度のチューニングを提供するソフトウェアの開発が待望されています。

本ドキュメントは、それらを実現した「ショウジョウバエ全ライフステージ個体別自動判定システム」(Drosophila Individual Activity Monitoring and Detection System; DIAMonDs)のソフトウェア部分に関するマニュアルです。

DIAMonDsは、撮像のためのハードウェアを含めたシステム全体の呼称であり、ライフイベント検出のためのアルゴリズムとそれを実装したソフトウェア部分が「Sapphire」という名称となっています。

Sapphireは、ショウジョウバエを用いた遺伝子研究現場において使用することを想定し開発されたものであり、「Dash」というフレームワークで動作しています。ブラウザベースのため動作が軽く、幅広い環境で使用できるというのが特徴です。

以下に、本ソフトウェアの使用方法を記します。

起動方法

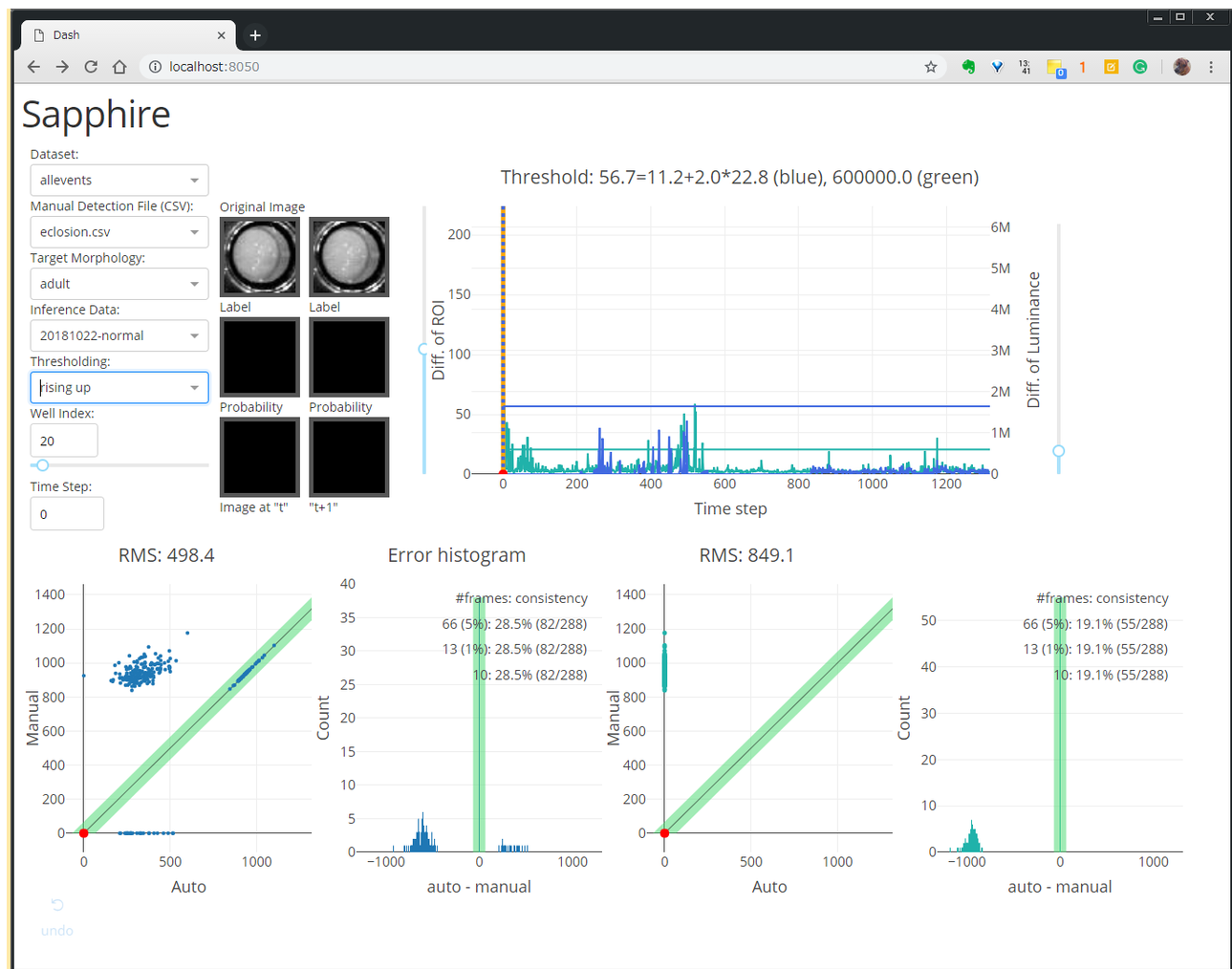
ブラウザを起動してアドレスバーに下記 URL を入力してアクセスしてください。

<http://localhost:8050/>
(または <http://127.0.0.1:8050/>)

使い方

各セレクトター、グラフの説明

アプリの全体図



アプリ全体のスクリーンショット

パラメータ選択とウェル画像の表示

左側のプルダウンメニューでは表示したいデータセット等のパラメータを選択します。右側には選択されたパラメータに対応した各画像が表示されます。それぞれの詳細な説明を以下に記します。

Dataset:
allevents

Manual Detection File (CSV):
eclosion.csv

Target Morphology:
adult

Inference Data:
20181022-normal

Thresholding:
rising up

Well Index:
20

Time Step:
0

Original Image

Label

Label

Probability

Probability

Image at "t" "t+1"

Dataset

表示したいデータセット（フォルダ）を選択します。

フォルダ内データは主に、同時飼育下におけるショウジョウバエ集団のタイムラプス画像ですが、解析をすすめるとともに、セグメンテーションの訓練結果や推論結果、信号データなども保存されます。同一フォルダ内データであるかによって、対応関係が識別されます。

Manual Detection File (CSV)

目視判定ファイルが存在する場合、ライフイベントごとにその判定結果を記したcsvファイルを選択し、読み込むことができます。（2018年11月1日現在、目視判定ファイルはcsvのみ対応しています。）

csvの行列は、撮像されたショウジョウバエ集団のウェルの配置に対応しており、対応する行列のセル内数値は、イベントが生起したタイミング（何枚目の画像）となっています。

pupariation.csv : 「蛹化」の目視判定結果

eclosion.csv : 「羽化」の目視判定結果

将来的には、目視データが存在しないデータを扱っていきませんが、目視データが存在する場合には、それらを読み込み、自動判定の精度を見積もることができます。また、目視データが存在しない場合でも、撮像環境（ショウジョウバエ集団画像の取得環境）が同一であれば、その精度を保証するためのチューニングとして用いることも想定されます。

Target Morphology

検出するショウジョウバエの形態を選択します。セグメンテーションの訓練は、幼虫と成虫の二種類で行っています（2018年11月1日現在）。

larva : 幼虫の検出結果（幼虫の教師データで訓練を行い、訓練後に幼虫のセグメンテーションを行った結果。信号としてはその差分を出力。）

adult : 成虫の検出結果（成虫の教師データで訓練を行い、訓練後に幼虫のセグメンテーションを行った結果。信号としてはその差分を出力。）

Inference Data

「推論」を行った結果のファイルです。

推論とは、（ヒトが作成した）予め答えがわかっている教師データを用いて訓練を行い、その後（訓練後）に新規データで（幼虫あるいは成虫のセグメンテーションを）行った結果のファイルです。

訓練に用いた教師データの数や内訳によって結果が異なるので、複数存在する場合があります。

訓練に用いた教師データの内訳には、以下のように名称が与えられています。

- ・ normal : 明らかに個体が存在するということが判別しやすいもの（を「訓練」に用いた）。
- ・ noisy : ノイズなどにより、一見しただけは個体が判別しにくいもの（を「訓練」に用いた）。
- ・ empty : （死角にいる？などの理由により）一見しただけでは、個体がいないように見えるもの（を「訓練」に用いた）。

2018年11月1日の時点では、主に上記三種を様々な割合で混合させて訓練を行ったネットワークを用いて推論を行いました。

Thresholding

セグメンテーションや輝度などを、「ある時刻 (t) 」と「その次のタイムステップ (t+1) 」の画像間の差分によって得られた信号を求め、それがある閾値を切った時点を特定のライフイベントとすることが、最もシンプルなアルゴリズムとなります。現時点 (2018年11月1日現在) では、信号の種別にかかわらず、いわば「活動量」のようなものを見ているため、ライフイベント検出に用いる際には、イベントごとの特徴を考慮する必要があります。例えば、「孵化」や「羽化」は個体の動きはじめのため「信号の立ち上がり時点」が検出候補ポイントとなり、反対に「蛹化」や「生命活動停止」は個体の動きが消失したタイミングであるため「信号の消失時点」が検出候補ポイントとなります。本ソフトウェアでは、信号の「立ち上がり時点」あるいは「消失時点」どちらを判定に用いるのかを選択することができます。言い換えるなら、閾値を「上から下に」あるいは「下から上に」横切った時点のどちらをライフイベント検出点とするのかをユーザーが選択することができます。

- ・ Rising Up : 信号の立ち上がり時点 (閾値を下から上へ横切った時点)
- ・ Falling Down : 信号の立ち下がり (閾値を上から下へ横切った時点)

Well Index , Time Step

注目するウェル番号、タイムステップを選択します。

Original image , Label , Probability

画像は、指定したウェルおよびタイムステップ(t)に対して、変化を比較するために(t+1)の画像を並べて表示します。左右の列がそれぞれのタイムステップに対応しています。

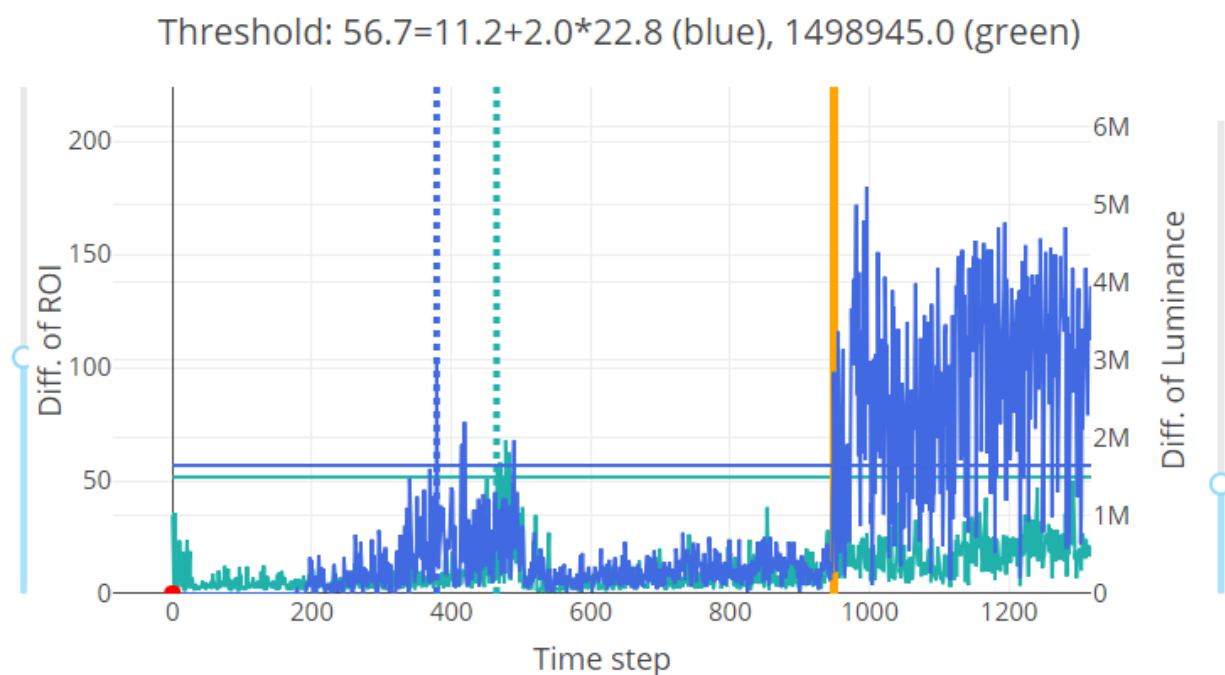
また、最上段は原画像、二段目はセグメンテーションの結果「個体 (の一部) 」と判定されたピクセルをラベルした画像となります (0 or 1の値をとります) 。

三段目は、セグメンテーションを行った結果算出される「そのピクセルが個体 (の一部) である確率」です (0-1の値をとります) 。この確率がある値 (2018年11月時点では、0.5) 以上の場合、そのピクセルは「個体 (の一部) 」とラベルされます。そのようにラベルされた結果が二段目に表示されています。

活動量シグナル表示部分

選択されたウェルの信号を表示する部分です。

(2018年11月1日現在、セグメンテーションによって得られた抽出領域の差分と、輝度値の差分から得られた信号の二種類です。)



信号の種類について

- 青色 : セグメンテーション結果から得られた差分信号。スケールは左側の軸
- 緑色 : 元画像の輝度値から得られた差分信号。スケールは右側の軸
- 赤点 : 現在注目しているタイムステップ (クリックにより変更可能)

閾値調整 (スライダバー)

「セグメンテーション結果の差分から得られた信号」と、「輝度値の差分から得られた信号」という2つの信号それぞれに対して任意の閾値を設定することができます。

(信号の色と対応)

閾値の変更により、下段の要約図（「自動・目視判定の比較散布図」および「自動・目視判定誤差のヒストグラム」）もリアルタイムで更新されます。

セグメンテーション結果による信号（青色）に関しては、デフォルトでは、「m: 全ウエルの信号平均」「s: 全ウエルの信号から得られた標準偏差」として、閾値を、「 $m + \alpha \times s$ (α はパラメータ)」で設定しており、ユーザーは、 α を $-5.0 \sim +10.0$ の範囲で設定することができる仕様になっています。また、全ウェル一律同じ閾値を適用しています（2018年11月1日時点）。

輝度値による信号（緑色）に関しては、信号のy軸と対応して閾値そのものをスライダバーによって設定します。

イベント検出点

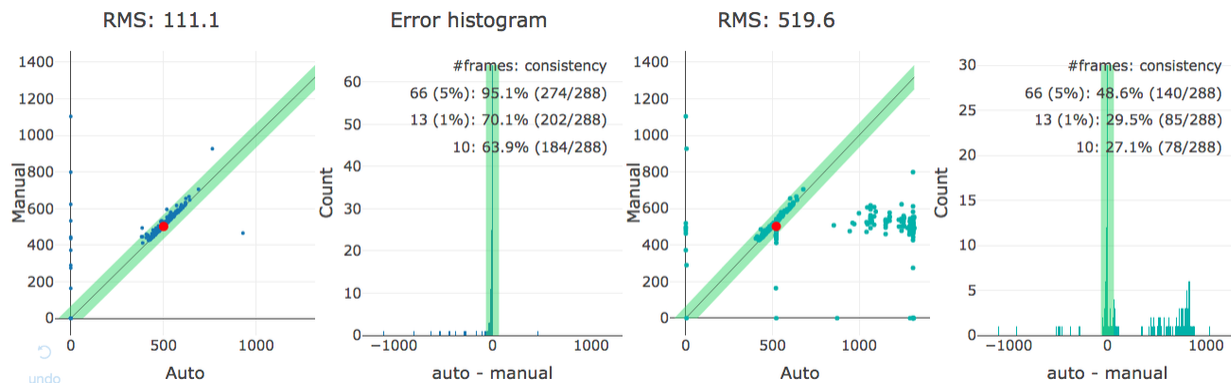
オレンジ：目視判定によるイベントの検出点（目視判定のcsvファイルが存在し、それを読み込んだ場合にのみ描画）

青点線：自動判定1（セグメンテーションにより得られた差分信号が、設定された閾値を横切ったタイミングにより算出される）によるイベントの検出点

緑点線：自動判定2（輝度値差分により得られた差分信号が、設定された閾値を横切ったタイミングによって算出される）によるイベントの検出点

イベントの検出結果

各シグナルに対して閾値処理を行い、イベント検出を行った結果を表示します。



目視判定と自動判定の比較

目視判定と自動判定の比較（散布図、ヒストグラム）

右2つ：自動判定1（セグメンテーションの差分信号を用いて判定されたイベントタイミング）と目視判定の比較

左2つ：自動判定2（輝度の差分信号を用いて判定されたイベントタイミング）と目視判定の比較

赤点：現在注目しているウェル

緑枠：目視判定と自動判定の誤差が全フレームの5%以内のもの

frames : consistency : 目視判定と自動判定との誤差が全フレームの5%、1%、10フレーム以内のものの割合

FAQ

リンク

[Dash by plotly](#)

[Dash のユーザーガイド](#)