

蛍光染色 3 次元画像からのレクチン陽性細胞の検出及び定量評価

Quantitative evaluation and detection of lectin-positive-cells in 3-dimensional fluorescent images

○稲村賢吾¹, 信末博行², 加野浩一郎², 塚本新³, 伊藤彰義⁴
Kengo Inamura¹, Hiroyuki Nobusue², Koichiro Kano², Arata Tsukamoto³, and Akiyoshi Itoh⁴

It is well known that angiogenesis have a relationship with an adipose tissue development process. We observed the development of the number of endothelial marker (IB4) positive cells existing around the sprouting vessel tips, in newborn ICR mice. We have developed a method of image processing for automatically detecting and counting the number of IB4-positive-cells. Then, we also have shown a relationship between the number of IB4-positive-cells and the development of adipose tissue, from the 3-dimensional images taken by a confocal fluorescence microscope.

1. 研究背景

現在, 脂肪細胞分化機構の分子レベルでの解明のほとんどは体外培養系を用いて検討されており, 体内における脂肪組織の発達機構はほとんど明らかにされていない. 脂肪組織の発達には血管新生が重要な役割を果たすことが知られている. 我々は体内における脂肪組織の発達過程を明らかにする目的で, ICR 新生子マウスの鼠径部の脂肪組織および血管の発達状況について観察を行った. 生後 1-3 日後の発達中の脂肪組織, 血管の伸長が観察されたが, 生後 4 日以降では血管の伸長は観察されなかった. 血管新生が確認された生後 1-3 日では, 脂肪組織の周縁部において伸長している血管先端部から少し離れた位置に血管内皮細胞特異的マーカー陽性の細胞 (レクチン陽性細胞) が多数観察された (Fig. 1).

これから血管新生とレクチン陽性細胞の間には密接な関係が考えられる. レクチン陽性細胞の出現状況を客観的に把握することを目的として, レクチン陽性細胞の特徴を定量化し自動抽出する手法を開発した.

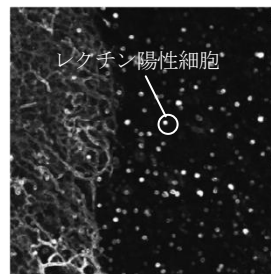


Fig. 1 Lectin-positive-cells and blood vessels.

2. 対象画像

共焦点顕微鏡により取得された赤く染色したレクチン陽性細胞の Red, Green, Blue 各成分 256 階調の 2 次元 (512×512) 蛍光染色画像が深さ (z) 方向に 20~44 枚ある 3 次元画像を対象とした. Green, Blue 成分の濃度値はすべて 0 であったので, Red 成分のみを用いた.

3. レクチン陽性細胞の特徴

3.1. 専門家の判断基準

生物学において 3 次元蛍光顕微鏡画像は, 任意の視点方向に投影処理を行い, 投影経路中の最大値を投影面に投影し 2 次元画像へ変換している. そのため, 専門家の判断は 2 次元画像上で行っている. 複数の専門

家がレクチン陽性細胞であると判断した細胞を基準 (Truth) とした.

3.2. レクチン陽性細胞の特徴

Truth 画像から得られたレクチン陽性細胞の特徴は, Fig. 2 に示すように円に近い形状で凹凸が少ない. また, 背景より明るく, 中心には細胞核があるため暗い.

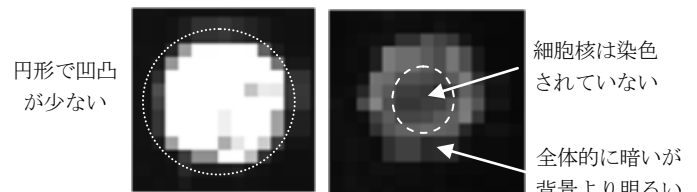


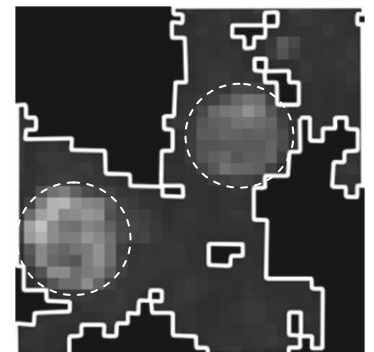
Fig. 2 Lectin-positive-cells.

4. 濃度値閾値決定

染色された「血管およびレクチン陽性細胞領域」と「背景領域」を分離する輝度の閾値を自動決定する方法として Kittler 法を用いた^[1]. Kittler 法は, 任意の双峰性分布を正規分布に近似したものから, ベイズ則に基づいて誤差が最小になるように分離する.

4.1. Kittler 法を用いた濃度値閾値決定

2 値化結果を目視確認すると, レクチン陽性細胞が背景領域に組み込まれ, 孤立していない領域がある (Fig. 3). 背景領域には染色剤の残りにより生じる明るい領域 (ノイズ領域) が広範囲に残り, レクチン陽性細胞場を内包している. この場合, 背景領域とレクチン陽性細胞の判別を行うことが出来ない.



レクチン陽性細胞: 点線
ノイズ領域: 実線
Fig. 3 Non-isolated lectin-positive-cells.

4.2. Kittler 法を用いた再閾値決定

4.1 のように, 背景領域 (ノイズ) とレクチン陽性細胞が接触した領域を分離するため, 小領域毎に再度 Kittler 法による閾値の自動決定する方法を用いた.

1: 日大理工・院・情報 2: 日大生物資源 3: 日大理工・教員・子情 4: 名誉教授, 理工学研究所上席研究員

4.3. 各小領域における閾値決定

各小領域で閾値を決めるとき領域が小さすぎると、濃度値ヒストグラムが単峰性を示す場合がある。Kittler 法では、このとき最小誤差点、すなわち閾値が単峰性ヒストグラムの裾付近となり、背景領域とレクチン陽性細胞が分離できない。単峰性を示し、最小誤差点が 4.1 で先に決定した閾値より低い値である場合には、領域を拡張(26 近傍)し濃度値ヒストグラムが双峰性を示すまで小領域を n 回膨張する。 n は実験的に 7 とした。それでもヒストグラムが単峰性を示す場合、4.1 で決定した閾値に再設定した。

5.3 次元形状特長によるレクチン陽性細胞の判別

これまでの処理では、2 次元画像上にレクチン陽性細胞、血管、ノイズが混在している。2 次元画像上での観察結果から、血管やノイズは凹凸が多く、大きさにばらつきがあるのに対して、レクチン陽性細胞は円形で一定の大きさであることが判明する。この特徴を活かした 3 次元画像上での判別に適した、3 次元特徴量を考案した。

5.1. レクチン陽性細胞の体積

大きさの特徴量を定義するため、レクチン陽性細胞の体積調査を行った。専門家の判定した 2 次元画像中のレクチン陽性細胞(Truth)と一致する領域を 3 次元画像中で抽出し、画面端やノイズなどに接触している領域(接触例)を除いた孤立した領域(典型例)のみを用い、レクチン陽性細胞の体積を求めた。体積の平均は 652 [voxel]、標準偏差は 141 [voxel]であった。

5.2. レクチン陽性細胞の球形度

2 次元画像中のレクチン陽性細胞は円形である。3 次元的には球形であるとして、球形度 S を、次のように定義した。

$$S = V_2 / V_1 \quad (1)$$

$$R = \sqrt[3]{V_1/4\pi} \quad (2)$$

V_1 : 注目領域の体積

V_2 : 注目領域の重心から半径 R 内に存在する注目領域の画素数

R : 注目領域を球としたときの体積 V_1 から推定される半径

球形度 S は 0~1 の値をとり、1 に近いほど球に近い。

5.1 と同様な測定から典型例の球形度の平均 0.73、標準偏差は 0.04 であった。

5.3. 形状閾値の決定

5.2, 5.3 の測定結果から、レクチン陽性細胞抽出のための特徴量として、

- ①体積平均 $\pm 3\sigma$, ②球形度平均 -3σ

を形状閾値とし、判別を行った。

6.3 次元形状特長による抽出結果

5. で決定した形状特徴閾値によるレクチン陽性細胞

の抽出率・過抽出率を次の式(2)(3)によって定義する。

$$(\text{Truth の抽出個数} - \text{過抽出}) / \text{全抽出数} \quad (3)$$

$$(\text{全抽出個数} - \text{Truth の抽出数}) / \text{Truth の個数} \quad (4)$$

どちらも 0~1 の範囲をとり、1 に近いほど抽出数が多い、抽出結果は抽出率 0.63、過抽出率 0.40 である。

過抽出の領域には、レクチン陽性細胞に近い特徴を持つものがある(Fig. 4)。2 次元上の判断で専門家が見落した可能性があり、3 次元上特徴により判別したことで専門家の見落としも判別する事が出来たと言える。

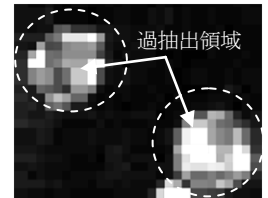


Fig. 4 Examples of detection errors.

7. 考察

画面端と接触している細胞は、3 次元上で見ると半球状で体積・球形度共に小さくなる傾向がある(Fig. 5)。



Fig. 5 2-D and 3-D images of lectin-positive-cells.

また、レクチン陽性細胞とノイズ、細胞同士が接近し 1 つの領域となる場合、画面端と接触する場合と同じく球形度が低くなる傾向が見られるが、体積が大きくなる(Fig. 6)。

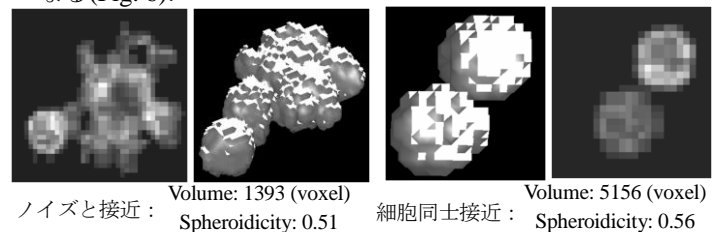


Fig. 6 2-D and 3-D images of lectin-positive-cells fused with other areas.

画面端と接触している場合や一定以上の体積を持つ場合には、体積・球形度の特徴量では判別出来ない。しかし、他の領域と接触している細胞は、体積・球形度に傾向が見られるため、今後はこの特徴を利用する。

8. まとめ

従来 2 次元画像により目視により実施されていたレクチン陽性細胞の個数計測について、3 次元画像処理による自動計測法を開発した。2 次元画像で見逃されたものが抽出できるが、体積・球形度の特徴量のみでは、画面端に存在する場合、ノイズ、細胞同士が接触している領域での抽出やノイズとの判別が不完全であった。新たな特徴量を定義し、判別の精度を向上させることが課題である。

参考文献

- [1] J. Kittler, J. Illingworth, and et al. : "MINIMUM ERROR THRESHOLDING", Pattern Recognition, Vol. 19, No. 01, pp. 41-47, (1986).