

血管新生とレクチン陽性細胞の関係性の定量評価について

The relationship between angiogenesis and positive lectin cells

飯田裕¹, 信末博行², 加野浩一郎², 伊藤彰義³Hiroshi Iida¹, Hiroyuki Nobusue², Koichiro Kano², Akiyoshi Itoh³

Abstract: We have previously reported that it is possible to study the process of adipose tissue development by using inguinal regions of newborn ICR mice just after birth. At 1-3 days after birth, vascular sprouting and branching markedly occurred angiogenesis concomitantly with adipogenesis, and a number of endothelial marker (IB4) positive cells were observed around the sprouting vessel tips. At 4 days or later, angiogenesis were entirely arrested, and further IB4 positive cells were not detected. These findings suggest that there are a close relationship between angiogenesis and IB4 positive cells during adipose tissue development. In this study, to identify objectively this relationship obtained from biological study, we analyzed the occurrence of IB4 positive cells during adipose tissue development by image processing that attention to the shape of these cells.

1. はじめに

現在、脂肪細胞分化機構の解明が分子レベルで進展しているが、これらの知見のほとんどは体外培養系を用いて検討されており、体内における脂肪細胞分化および脂肪組織の発達機構の詳細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。これまで、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。その結果、生後 1-3 日後の発達中の脂肪組織では、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。さらに、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 (IB4) 陽性の細胞 (レクチン陽性細胞) が多数観察された (Fig. 1)。このことから、脂肪組織の発達時に観察される血管新生とレクチン陽性細胞の間には密接な関係があると考えられる。

本研究では、脂肪組織および血管の発達にかかわると考えられるレクチン細胞の出現状況を客観的に把握することを目的として、血管新生時におけるレクチン陽性細胞数を計測する画像処理手法を開発した。球形度、凹凸度、主軸方向に対する領域の断面積の変化からレクチン陽性細胞の形状を判定することによって、レクチン陽性細胞の数を計測した。

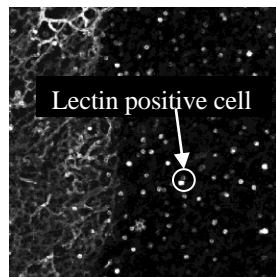


Fig. 1 Lectin positive cells and blood vessels

2. 対象画像

今回使用した画像は、レクチン陽性細胞を赤く染色した Red, Green, Blue 各成分 256 階調の濃度値からなる蛍光観察画像である。ただし Green, Blue 成分の濃度値がすべて 0 であるため本手法においては Red 成分のみを用いた。画像サイズは縦 597 [pixel], 横 597 [pixel] (実スケール縦 600 [μm], 横 600 [μm]), スライス枚数は 44 枚, スライス間隔は 1.16 [μm] である。

3. 前処理

3-1. 二値化

レクチン陽性細胞を染色したため、レクチン陽性細胞は濃度値が高い。そのため、レクチン陽性細胞の最小濃度値である 33 を閾値として、二値化を行い、対象領域が 1、背景領域が 0 の二値画像を作成した。

3-2. 背景ノイズの除去

二値化の際に局所的に高い濃度値を持つ背景領域がノイズとして問題となる。このノイズ領域の体積はレクチン陽性細胞に比べ小さい。そこでレクチン陽性細胞の最小体積である 168 [voxel] を閾値として背景ノイズの除去を行った。

3-3. 血管領域の除去

レクチン陽性細胞と血管領域の濃度値分布が大きく重なるため、血管領域がレクチン陽性細胞を計測する際の障害となる。そこで、血管領域は常に画像の端から伸びているという取込み画像の性質を利用して血管領域の除去を行った。二値画像に対して、対象領域である濃度値が 1 の画素の集合を個別に扱うためにそれぞれ番号を付けて区別する (三次元 26 近傍ラベリング処理)。同番号の集合を関心領域と呼ぶ。関心領域内の画素が 1 つでも画像全体の上下側面に接しているならば、その領域を血管領域として除去を行った。

4. レクチン陽性細胞の個数計測手順

画像中には、球状の単体レクチン陽性細胞、少数であるが 2 つのレクチン陽性細胞同士が接触しているもの、染色する際に起こる手技的なアーチファクトが存在する。単体で存在しているレクチン陽性細胞と、レクチン陽性細胞同士が接触しているものでは形状が異なるため、異なる判別方法を用いる必要がある。まず、各関心領域に対して、球形度と凹凸度によって単体で存在しているレクチン陽性細胞の判別を行う。その後、画像中のレクチン陽性細胞と判別されなかった関心領域に対して、レクチン陽性細胞同士が接触しているものとアーチファクトを判別するために、主軸方向に対する領域の断面積の変化からレクチン陽性細胞の形状判定を行った。

5. 球形度、凹凸度によるレクチン陽性細胞の判別

レクチン陽性細胞が単体で存在している場合、球形で凹凸が少ないという特徴がある。そこで、球形度と凹凸度という 2 つの特徴量を定義し、レクチン陽性細胞の判別を行った。

5-1. 球形度 (Sphericity)^[2]

関心領域の球形の程度を示す特徴量である。0~1 の値をとり、1 に近いほど関心領域が球形に近い。球形度は式(1)によって定義される。

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

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

V_1 : 関心領域の体積。

R : 関心領域が球だとした時の体積 V_1 から推定される半径。

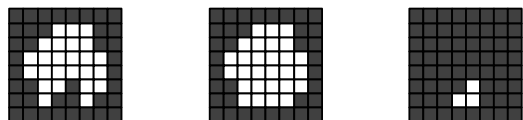
V_2 : 関心領域の重心から半径 R で描いた球と関心領域の重なる部分の体積。

5-2. 凹凸度 (Roughness)

関心領域の凹凸の程度を示す特徴量である. この値が大きいくほど関心領域が凹凸の程度が大きいことを示す. 凹凸度は式(3)によって定義される.

$$\text{凹凸度} = \text{凹領域の体積} / V_1 \quad (3)$$

V_1 は関心領域の体積である. 凹領域の体積の求め方を次に示す. 説明の簡単化のため, Fig. 2 に 2 次元の例を示す. 対象画像の濃度値を, 濃度値が関心領域が 1, 背景領域が 0 である三次元二値画像とする (Fig. 2(a)). まず, 関心領域の任意の 2 点を結び, その線が通る直線上の画素を 1 に変換した穴埋め画像を作成する (Fig. 2(b)). 穴埋め画像から対象画像の差をとることで凹領域画像作成し (Fig. 2(c)), 画像中の濃度値が 1 である画素数を数えることで, 凹領域の体積を求める.



(a) Original. (b) Plug. (c) Roughness.
Fig. 2 Roughness Process (ex. 2D image).

6. レクチン陽性細胞同士が接触したものの判別

レクチン陽性細胞同士が接触したものは球形ではないため, 球形度と凹凸度の特徴量だけでは判別が困難である. そこで, レクチン陽性細胞同士が接触している場合は球形が 2 つ接触した形状であることに着目し, 主軸方向に対する断面積の変化を特徴とした形状判別法を提案する.

6-1. 主成分分析による主軸の決定

レクチン陽性細胞同士が接触しているとき, それが接触している方向に関心領域が広がる. 主成分分析は, 多くの変量からなるデータに対してデータの分散が最も大きくなる軸を求める手法である. 変量に関心領域の画素の座標である場合に主成分分析を用いると, 分散が最も大きくなる軸は関心領域の最も分散している方向 (主軸の方向) を向く. そのため, 主軸の方向がレクチン陽性細胞同士が接触している方向であると考えられる. そこで, 以下の方法により主軸を求める. 対象画像 $f(x,y,z)$ を, 縦 n_x [voxel], 横 n_y [voxel], 高さ n_z [voxel], 濃度値が関心領域が 1, 背景領域が 0 の三次元二値画像とする. 対象画像より, 式(4)のように分散共分散行列を定義し, その固有値, 固有ベクトルを求める. 最大の固有値に対する固有ベクトルが主軸の方向である.

$$V = \sum_{i=0}^{n_x-1} \sum_{j=0}^{n_y-1} \sum_{k=0}^{n_z-1} f(i,j,k), \quad x_{ijk} = (i - x_g) f(i,j,k)$$

$$y_{ijk} = (j - y_g) f(i,j,k), \quad z_{ijk} = (k - z_g) f(i,j,k)$$

$$\text{vec} = (x_{ijk} \quad y_{ijk} \quad z_{ijk})$$

$$\begin{bmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{xy} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{xz} & S_{yz} & S_{zz} \end{bmatrix} = \frac{1}{V} \sum_{i=0}^{n_x-1} \sum_{j=0}^{n_y-1} \sum_{k=0}^{n_z-1} (\text{vec}' \times \text{vec}) \quad (4)$$

ただし, x_g は x 軸方向の関心領域の重心, y_g は y 軸方向の関心領域の重心, z_g は z 軸方向の関心領域の重心. vec' は vec の転置ベクトルである.

6-2. 断面積計測

アフィン変換により主軸方向が z 軸になるように関心領域を回転させる. z 軸に対する関心領域の x-y 断面の面積を計測し, z 軸方向に対する x-y 断面積のグラフを作成する (Fig. 3). この際, グラフに対して式(5)によって平滑化を行う.

$$F_c(z) = \{Fcb(k-1) + Fcb(k) + Fcb(k+1)\} / 3 \quad (5)$$

ただし, $F_c(z)$ は平滑化後の z 軸に対する断面積の関数, $Fcb(z)$ は平滑化前の z 軸に対する断面積の関数である.

これは関心領域表面の細かい凹凸や, デジタル画像を対象としているために発生する回転による量子化誤差の影響を抑えるためである.

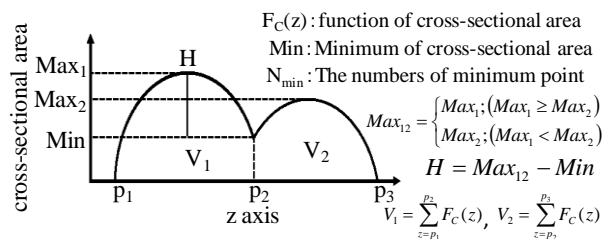


Fig. 3 Position of principal axis and cross-sectional area.

Fig. 3 に示すように特徴量を定義した. 関心領域が Table. 1 に示す 3 つの条件すべてに当てはまるならば, その関心領域をレクチン陽性細胞同士が接触しているものとした.

Table. 1 Features of positive lectin cell

条件	意味
$N_{\min}=1$	断面積の極小点の個数 N_{\min} が 1 である.
$V_1 \geq 168$ and $V_2 \geq 168$	V_1 と V_2 がレクチン陽性細胞の最小体積である 168 以上である.
$H \geq 64$	V_1 と V_2 が良く分離されている. 閾値 64 は実験的に決定した.

7. 結果

抽出結果を Table. 2 に示す.

Table. 2 Result.

画像処理による計測結果	122 個
目視による抽出不足の判別	7 個
目視による過抽出の判別	1 個

8. 考察

8-1. 抽出不足に対する考察

僅かだが画像中にアーチファクトとレクチン陽性細胞が接触しているものが存在している (Fig. 4). 今回, これをレクチン陽性細胞として抽出することは出来なかった. この問題を解決するためにはアーチファクトとレクチン陽性細胞が接触しているものの特徴を新たに定義する必要があり, 今後の課題である.

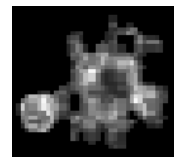


Fig. 4 A noise and a lectin positive cell

8-2. 二値化閾値について

今回用いた二値化閾値 33 は使用した画像から目視によって確認し, 決定したものである. 今後, 本手法を血管新生時の経時的な画像群に適用する際には, 統計的にこの閾値を検討する必要があると考えている.

9. まとめ

脂肪組織および血管の発達にかかわると考えられるレクチン細胞の出現状況を客観的に把握することを目的として, 定量的にレクチン陽性細胞の個数を計測する画像処理手法を開発し, 実験を行った. 今後は 8-1 に示す問題を解決し精度を向上させるとともに, 血管新生時の経時的な画像群を対象としレクチン陽性細胞数を計測することで, レクチン陽性細胞と脂肪組織および血管の発達の関係性を明らかにしたい.

10. 参考文献

- [1] A Johnson 他, 「THE CELL 細胞の分子生物学 第 4 版」, Newton Press, pp.1279, 2004.
- [2] 齊藤剛史, 池田雅敏, 青木公也, 金子豊久, 関口隆三: 「CT 画像における工合解析に基づく肝臓内血管の抽出と肝臓癌の検出」, 電子情報通信学会論文誌, Vol. J87-D-II, No.6, pp.1359-1368, 2004 年 6 月.