

G-1

蛍光染色画像解析による脂肪細胞と乳腺上皮細胞の変化の定量評価

Quantitative evaluation of changes in fat cells and mammary epithelial cells by image analysis of fluorescent staining

○宮脇輝¹, 信末博行², 加野浩一郎², 伊藤彰義³

Akira Miyawaki¹, Hiroyuki Nobusue², Koichiro Kano², Akiyoshi Itoh³

Abstract: It is well known that, in mouse mammary tissue, the number of mammary epithelial cells is rapidly increased and simultaneously the number of fat cells is decreased during pregnancy. The purpose of this study is to show the quantitative evaluation of changes this phenomenon as a function of time by extracting, counting and measuring the area of those cells automatically from fluorescence microscopy images with the developed image processing code.

1. はじめに

マウスの乳腺組織において、妊娠中に脂肪細胞が減少し、乳腺上皮細胞が急速に発達することが知られている。本研究は、この現象に対し乳腺上皮細胞と脂肪細胞の経時的な変化を定量評価し、客観的なデータを提示する事が目的である。蛍光顕微鏡画像上で脂肪細胞、乳腺上皮細胞の抽出を行い、これらの面積比を求めた。

2. 対象画像

対象画像は蛍光染色された交配 13 日、交配 16 日、交配 19 日、分娩 3 日、分娩 5 日、分娩 10 日経過後それぞれ 4-6 枚ずつ、合計 33 枚あり、Red, Green, Blue(以下 RGB)毎に 256 階調のカラー画像である。

3. 乳腺上皮細胞、脂肪細胞膜、細胞核の抽出

3.1 蛍光染色された領域の特徴

対象画像中では、乳腺上皮細胞、脂肪細胞、細胞核の 3 種類が染色されている。

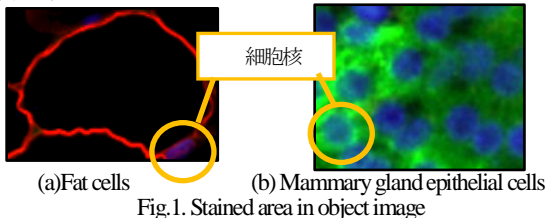


Fig.1. Stained area in object image

脂肪細胞(Fig.1.(a))は蛍光染色の性質上、外部の膜のみが染色されており、赤い線である。乳腺上皮細胞(Fig.1.(b))は緑色の領域である。乳腺上皮細胞、脂肪細胞共に細胞核が存在し、半径 4~10 [pixel]の円または楕円で共に青色である。

3.1 染色されていない領域 (背景領域) の定義

対象画像中 2 枚の暗い領域にうっすらとノイズが生じている。ノイズの濃度値を調査した結果、RGB 濃度値のいずれも 99%以上が 10 以下であったため、 $R>10$ かつ $G>10$ かつ $B>10$ の領域を背景領域とした。

3.2 判別分析による染色された領域の判別

蛍光染色による色の違いに着目し、乳腺上皮細胞、脂肪細胞膜、細胞核の判別を行う。

上記 3 領域について対象画像内の各領域の濃度値を調査

した結果、RGB の 3 次元空間において各領域はそれぞれ異なる輝度値の分布となった(Fig.2)ため、マハラノビスの汎距離により、未知データを最も確率の高いクラスとする判別分析^[1]を行った。

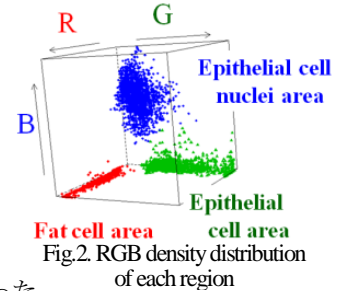


Fig.2. RGB density distribution of each region

判別分析を適用することにより、乳腺上皮細胞領域、脂肪細胞膜領域、細胞核領域を抽出した (Fig.3)。

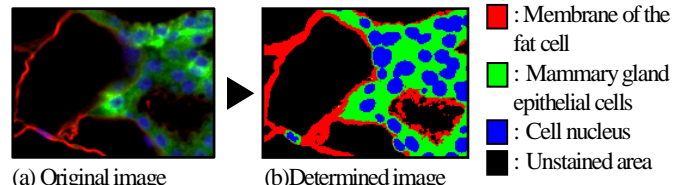


Fig.3. Extraction of each region by discriminant analysis

4. 背景領域の判別

4.1 背景領域について

背景領域は脂肪細胞の内部、もしくは腺腔(分泌された乳汁を一時的に溜める役割をもつ)である。腺腔は空洞であるため脂肪細胞、乳腺上皮細胞いずれにも含めない。そこで背景領域が脂肪細胞内部か、腺腔か判別を行う。

4.2 日数経過による腺腔の変化

腺腔は乳腺上皮細胞に囲まれているという特徴を持ち、乳腺組織の発達過程で異なる性質を持つ(Fig.4)。中期のみ周辺に赤く細かい凹凸があり、内部に赤い領域が見られる場合もある(Fig.4.(b))。

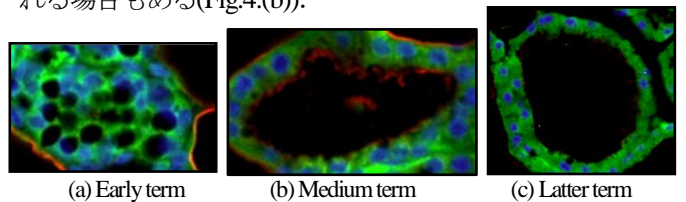


Fig.4. Changes in the glandular cavity

4.3 周辺領域の色の違いによる特徴量

背景領域の周囲は 3.2 により、画素毎にどの領域であるか既知である(Fig.5)ため、周囲の脂肪細胞膜と乳腺上皮細胞の濃度値の比率を特徴量とし、周囲の領域は膨張処理により拡張した画素と拡張前の領域の差分を取るこ

1 : 日大理工・院・情報 2 : 日大生物資源 3 : 日大理工・教員・子情

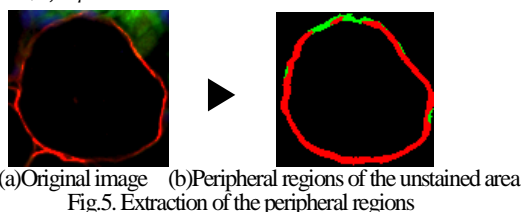
とで得られる。拡張した画素数は脂肪細胞膜の平均太さとして、4 近傍距離で 4 画素とした。

$$Rate_{Green-Red} = \frac{\sum R(i, j)}{\sum G(i, j) + \sum R(i, j)} \quad (2)$$

$G(i, j)$: 乳腺上皮細胞の Green の濃度値

$R(i, j)$: 脂肪細胞の Red の濃度値

$Rate_{Green-Red}$ のしきい値は脂肪細胞内部の平均 μ と標準偏差 σ より、 $\mu - 3\sigma$ とした。

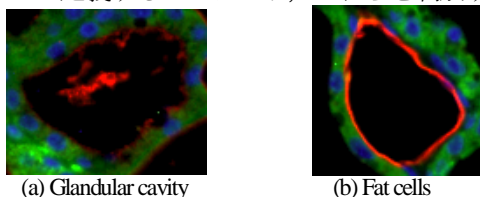


(a)Original image (b)Peripheral regions of the unstained area
Fig.5. Extraction of the peripheral regions

5.中期の腺腔と脂肪細胞内部の判別

5.1 乳腺上皮細胞に囲まれた領域

中期の腺腔(Fig.6(a))は周囲に赤く細かい凹凸があるので、4.3 で述べた手法だけでは脂肪細胞膜(Fig.6(b))と判別される可能性がある。脂肪細胞内部の周囲にある膜は、はっきりとした線であるため、輪郭上の細かい凹凸を特徴量として定義することにより、これらを判別する。



(a) Glandular cavity (b) Fat cells
Fig.6. A region surrounded by mammary epithelial cells

5.2 輪郭上の細かい凹凸の有無による特徴量

フーリエ記述子^[2]により、背景領域の外部輪郭を閉曲線と見立てた周期関数を求め、式(3)によりフーリエ級数展開する。そして得られた周波数軸での帯域通過フィルタにより細かい凹凸が含まれる振幅スペクトル A_k (式(4))を取り出し、平均(式(5))を特徴量とすることにより、凹凸の有無を評価する。

$$F_k = \frac{1}{N} \sum_{x=0}^{N-1} f_x \exp(-i2\pi kx / N) \quad (3)$$

F_k : 第 k 次高調波の振幅 N : データ数

$$A_k = \sqrt{a_k^2 + b_k^2} \quad (4)$$

a_k : \cos の k 次高調波成分 b_k : \sin の k 次高調波成分

$$F_{AVE} = \frac{1}{n_2 - n_1} \sum_{k=n_1}^{n_2} F_k \quad (5)$$

F_{AVE} : 通過帯域の平均値 n_2 : 通過帯域の下限次数 n_1 : 通過帯域の上限次数

しかし、周期関数の物理的な周期は周囲長によって異なる。そこで波長を横軸とすることにより、凹凸の物理的な周期による振幅を求めた。腺腔の物理的な凹凸の周期として 20~25[px]とし、このときのしきい値をマハラノ

ビスの距離を使った判別分析により決定した。

7. 結果

上記の手法により抽出した脂肪細胞、乳腺上皮細胞、腺腔の面積比を Fig.7 に示し、比較のため目視で求めた境界線による面積比を Fig.8 に示す。なお、本手法で抽出した細胞核は全て乳腺上皮細胞とする。

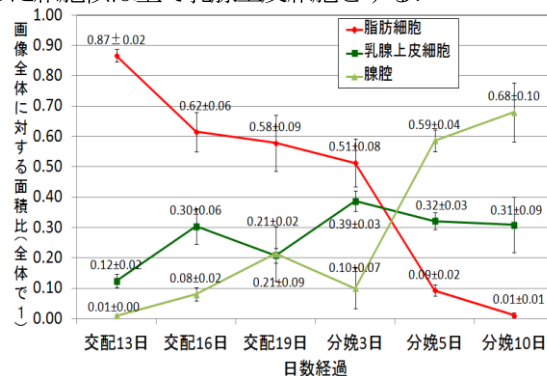


Fig.7. Area ratio of each area extracted by the method

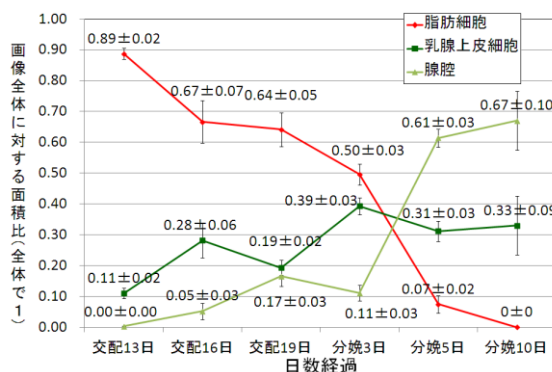


Fig.8. Area ratio determined by visual comparison

脂肪細胞、乳腺上皮細胞、腺腔のいずれも、本手法による結果と目視で求めた境界線による結果の平均値の差が ±6% 以内であった。

8. 考察

腺腔は乳腺上皮細胞に囲まれているという仮定であったが、交配 19 日に乳腺上皮細胞が途切れている腺腔があったため、1つの腺腔として評価できない場合があった。

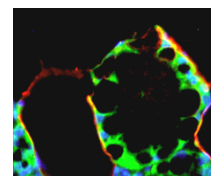


Fig.9. Glandular cavity of mammary epithelial cells break 19 days after mating

9. まとめ

乳腺上皮細胞と脂肪細胞の経時的な変化を定量的に評価した。蛍光顕微鏡画像上の色の違いにより、染色されている脂肪細胞膜、乳腺上皮細胞を抽出し、背景領域から脂肪細胞内部を抽出した。そしてこれらの面積比を求めた結果、乳腺上皮細胞の増加と脂肪細胞の減少が確認された。今後は精度を上げるとともに、脂肪細胞、乳腺上皮細胞の個数を定量評価することが考えられる。

10. 参考文献

- [1]藤沢偉作:「楽しく学べる多変量解析法」現代数学社,1985.
- [2]Zahn CT,Roskies PZ:Fourier description for plane closed curves.IEEE Trans comput C-21(3):269-281,1972