

## 細胞の形態及び運動計測のための画像解析アルゴリズム

### Image Analysis Algorithm for Cell Morphology and Kinematics Measurement

月精智子 Tomoko GESSEI

(お茶の水女子大学ライフサイエンス専攻)

#### 1. 背景

コンピュータやデジタル機器の性能向上に伴い、画像解析が広く利用されるようになった。生物学や医療分野に関しても、画像化技術、染色技術、画像解析システムの目覚ましい進化により、細胞画像に画像解析技術を応用することが可能となってきた。さらに、コンピュータでの汎用画像処理、画像解析ソフトウェアの利用が一般化している。

薬剤評価、癌細胞の研究、組織再生、シグナル伝達機構の解明、傷害修復の解明などを目的とした *in vitro* 研究として、培養細胞モデルを作成し、作成したモデル細胞の運動性を Time Lapse 画像に基づき、画像解析により定量化する手法がある。Zahm らは、培養気道上皮細胞に化学的傷害を作成した *in vitro* 系傷害モデルを用い、染色した細胞核の画像解析により、個々の細胞と細胞集団の運動性を定量化した<sup>1)</sup>。しかし、現在の染色技術では長時間観察、細胞形態の計測は不可能である。我々は、培養腹膜モデルに機械的傷害を与え、その修復過程における細胞運動性を染色することなく定量化してきた<sup>2)</sup>。その結果、傷害修復は、細胞の遊走、増殖、肥大化により行われるが、遊走が占める割合が 68% と最も高いことを明らかにし、この手法が有効であることを示した。そこでの研究では、腹膜中皮細胞の Time Lapse 画像解析は全てマニュアルで行い、汎用画像解析ソフトウェアを使用しても、煩雑な処理段階を要するものであった。さらに、損傷後の修復過程は 2-3 日であり、この間の全 Time Lapse 画像は数千枚となる。そのため、作業の省力化、すなわち自動化が求められる。

#### 2. 目的

本研究では、長時間の組織構築過程において、解析の効率化を求め、細胞の形態・運動計測が可能で、自動化細胞追跡アルゴリズムを作成することを目的とする。また、細胞遊走のみならず、細胞増殖にも注目し、細胞分裂の検出が可能でアルゴリズムを作成する。

#### 3. 方法

##### 3-1 組織構築モデル作成

ヒト大網から単離した腹膜中皮細胞を  $\phi 35$  mm の培養プラスチックシャーレ (住友ベークライト株式会社製) 上で sub confluent になるまで培養し、傷害モデル実験に用いた。培養した細胞群にピペットチップで幅 0.5 mm のスクラッチを作成し、機械的ストレスを加えた。炭酸ガス培養装置 (MI-IBC, オリンパス社製: 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) 内に設置した培養シャーレを、倒立位相差顕微鏡 (IMT-2, オリンパス社製) にて連続観察し、傷害修復過程を CMOS カメラ (U-PMTVC, オリンパス社製) にて 5 分毎に撮影した。約 3.5 日間にわたり連続撮影した 1000 枚の撮影画像を画像取り込みソフトウェア XCAP v2.2 (EPIX Inc.) に

て PC に取り込み、256 階調のグレースケールに変換した。傷害面積消失前の 320 枚と消失後の 320 枚、計 640 枚の画像を解析に使用した。

##### 3-2 アルゴリズム作成

画像解析は、画像処理ソフト OPTIMAS 6.1 (Media Cybernetics, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。画像処理範囲はスクラッチの対称性を考慮した。細胞抽出には Threshold 法を用いた。本法は、画素濃度に閾値を設定し、その閾値よりも画素濃度が低い部分 (細胞輪郭) を特徴形状として、個々の細胞を分離抽出する方法である。細胞追跡の自動化は、OPTIMAS 6.1 の Macro 言語を用い、ループ構文を使用することにより実現した。

作成した細胞追跡アルゴリズムを以下に説明する。まず、追跡対象となるターゲット細胞を任意に決め、初期画像の細胞重心位置 (X position, Y position) ならびに細胞面積をマニュアルにて計測する。次画像においては、この計測データに基づき、ターゲット細胞を含みうるような適切な円形状の領域 ROI (Region Of Interest) を設定し、ROI 内の細胞を Threshold 法により分離抽出する。その際、複数個の細胞が抽出された場合には、細胞の重心位置の移動距離、面積、真円度変化が最小のものをターゲット細胞と決定する。一方、いかなる細胞も抽出されなかった場合には、画素濃度の閾値を変化させることで細胞を検出した。また、細胞分裂は細胞特徴量に基づいて検出した。抽出した細胞の特徴量 (重心位置、面積、周囲長、真円度、最短軸、最長軸、輝度値平均、輝度値標準偏差) は PC に保存した。以上の内容を Macro 言語にて作成し自動化した。

##### 3-3 アルゴリズム検証

傷害直後の画像内に存在する細胞に番号 (1~220) を付し、初期画像における細胞特徴量データを予め手動で取得した。乱数表を使用し、アルゴリズム検証に使用する細胞をランダムに 30 個選び出した。これらの細胞のうち、最後まで撮影画像内にとどまった 23 個の細胞をアルゴリズム検証に用い、細胞抽出の成否を目視にて確認した。なお追跡率は、個々のターゲット細胞に対して、(次画像で追跡し得た画像枚数) / (全画像枚数) とした。その他、1 個の細胞追跡に要した時間、画像 1 枚の解析に要した時間、連続的に自動追跡可能であった画像枚数に基づき、アルゴリズムの性能評価を行った。

#### 4. 結果

##### 4-1 アルゴリズム検証結果

表 1 に本研究で作成したアルゴリズムの性能を示す。表に示すように、本アルゴリズムが任意の細胞を次の画像で正確に検出できる成功率は 81.9 ± 15.6% であった。また、1 個の細胞の追跡に要する平均時間は約 1 時間であり、連続追跡画像枚数は 60.5 ± 49.4 枚であった。なお、最も良好に追跡してきた細胞の追跡率は 99.5% で、要した時間は 22 分であった。

図1に本アルゴリズムを用いて Time Lapse 画像内の細胞分裂を追跡した例を示す。ROI が適切に設定され、ターゲット細胞が分裂する様子が良好に検出されていることが分かる。細胞分裂の直前には、細胞画像の平均輝度値が増加し、面積が減少し、真円に近くなることが分かる。

表1 細胞追跡アルゴリズムの性能評価

追跡率 (%)	追跡時間/a cell (分)	処理時間/1画像 (秒)	平均連続追跡枚数 (枚)
81.9±15.6	64.7±31.9	5.7±2.8	60.5±49.4

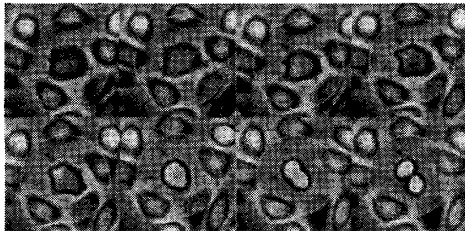


図1 細胞分裂の検出例

4-2 アルゴリズムの応用(傷害修復メカニズムの解明)

本アルゴリズムを用い、ヒト腹膜中皮細胞に作成した幅 0.5 mm の機械的傷害が修復する過程を評価した。

作成した傷害は、約27時間後に消失した。図2には傷害面積消失前後の細胞の移動軌跡、図3には細胞の移動速度と細胞面積の経時変化の1例を示す。図2に示すように、傷害面積が消失するまでの間は傷害周辺細胞は傷害中心部に移動すること、また、傷害面積消失後には細胞はランダムに遊走することが分かった。図4には、傷害修復における細胞の役割を示した。傷害修復は、63.3% (19 個) が細胞遊走、16.7% (5 個) が細胞増殖によりなされることが分かった。

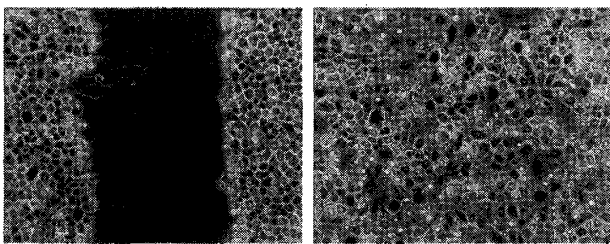


図2 傷害面積消失前後の細胞の移動軌跡

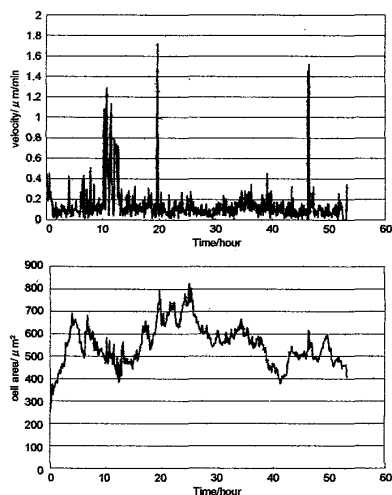


図3 細胞の移動速度(上)と面積(下)の経時変化例

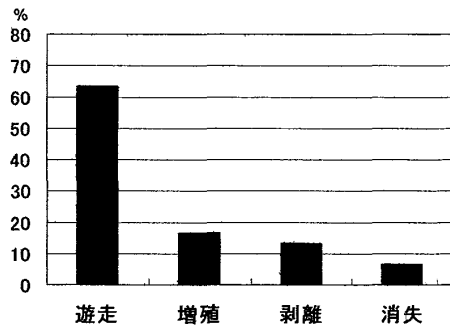


図4 傷害修復における細胞の役割

5. 考察

本アルゴリズムにおいて自動追跡が失敗する原因として、①隣接細胞との接触、②他の剥離細胞との重複、③細胞境界の曖昧化、④細胞剥離が挙げられる。

本アルゴリズムの具体的な応用例としては、傷害修復メカニズムの解明、組織工学、細胞間相互作用、細胞遊走、幹細胞の分化・増殖、薬剤評価などが考えられる。組織工学の観点からみた今後の展望としては、①3次元撮影を行い、立体データを取得する、②化学染色をして得たシグナル伝達機構のタンパク質データと細胞追跡で得た細胞運動データを統合し、遊走因子の影響を探索する、③動画で染色細胞を追跡する、等が挙げられる。

6. 結論

Time Lapse 画像に基づき、細胞を自動追跡し、時間変化する細胞特徴量を定量かつ自動的に取得可能なアルゴリズムを開発した。また、開発したアルゴリズムをヒト腹膜中皮細胞のスクラッチモデルに適用し、評価を行った。

[参考文献]

- 1) Jean-Marie Zahm, et al., *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37:33-34, 1997.
- 2) Takashi Horiuchi, et al., *Kidney Int.*, 64:2280-2290, 2003.

[発表状況]

- 1) 月精智子, 太田裕治, 組織構築評価のための画像情報に基づく細胞の形態・運動解析, 生活工学研究, 7(2), 194-195, 2005.
- 2) 月精智子, 大塚知恵, 坂野真利, 太田裕治, 堀内孝, 組織構築評価のための画像情報に基づく細胞の形態・運動解析アルゴリズム, 人と福祉を支える技術フォーラム, 2005年3月, 東京.
- 3) 月精智子, 大塚知恵, 坂野真利, 太田裕治, 堀内孝, 組織構築評価のための画像情報に基づく細胞の形態・運動解析アルゴリズム, 第14回バイオイメージング学会学術集会, 2005年10月, 東京.
- 4) 月精智子, 大塚知恵, 坂野真利, 宮本啓一, 太田裕治, 堀内孝, 組織構築評価のための画像情報に基づく細胞の形態・運動解析アルゴリズム, 第21回ライフサポート学会大会, 2005年12月, 三重.
- 5) Tomoko GESSEI, Chie OHTSUKA, Masatoshi BANNO, Keiichi MIYAMOTO, Yuji OHTA, and Takashi HORIUCHI, "An Image Analysis Algorithm for Kinematics and Morphology Measurement of Cells for the Evaluation of Tissue Construction", World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Aug. 2006, Seoul.

(指導教員 太田裕治)