

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
Image Analysis for Kinematics and Morphological Measurement of Cells
for the Evaluation of Tissue Construction

月精智子, 太田裕治

Tomoko GESSEI, Yuji OHTA

(お茶の水女子大学大学院 ライフサイエンス専攻)

1. 背景

医療分野において画像処理技術は大きく貢献してきた。各種断層撮影装置は言うまでもなく、細胞を画像処理することで、薬剤評価や傷害修復過程の評価などが行われている。後者の主な処理方法は、細胞輪郭の抽出、特徴量の定量化、細胞形態・運動の解析である。また、その研究の多くは細胞そのものを解析対象とするため¹⁾、限られた時間内に少数の細胞を解析することが一般的である。しかし、傷害修復過程の評価や薬剤評価のためには、個々の細胞だけではなく、細胞群である組織としての特性の解析が必要であり、従来開発されてきた画像処理技術は莫大な数の細胞からなる組織の特性の解析には適当ではない。したがって、細胞トラッキング機能など、細胞群である組織を解析対象とした画像処理ソフトウェアの開発が新たに求められる。これらのソフトウェアは、近年盛んに研究が行われている組織工学や再生医学分野の研究ツールとしても利用可能である。本稿では、これまでに開発を行ってきた、大量の細胞を長時間にわたって解析可能な画像処理アルゴリズムに関して述べる。

2. 目的

組織としての特性解析が可能な画像処理アルゴリズムを開発するとともに、それを用いて傷害修復過程の解析評価を行う。

3. 方法

3-1 傷害モデルの作成, 画像撮影方法

ヒト大網から単離した腹膜中皮細胞をφ35 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(90%程度)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(2-200 μl)で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(IX-IBC, オリンパス社製: 37 °C, 5 %CO₂)内に設置した培養シャーレを、倒立位相差顕微鏡(IX70, オリンパス社製)

にて連続観察することで傷害モデル修復過程を評価した。細胞画像データはCCDカメラ(HC-300Z/OL, オリンパス社製)にて1分毎に取得した。すなわち、7時間にわたり連続撮影した421枚の画像を画像解析に使用した。

3-2 アルゴリズム作成方法

撮影画像をPC(personal computer)に取り込み、前処理として256階調のグレースケールに変換し、画像処理ソフトOPTIMAS 6.1を用いて解析を行った。まず、元画像に平滑化处理、強調処理を施した後、Watershed法により細胞抽出を行った。Watershed法とは、画素濃度で閾値を設定し、その閾値よりも画像濃度が低い(濃い)ところを山、高い(薄い)ところを谷とし、谷の部分を検出して細胞を分離抽出する方法である。

この一連の作業をOPTIMAS 6.1のMacro言語を用いて作成し、Trackingアルゴリズムとした。使用したアルゴリズムのフローチャートを図1に示す。

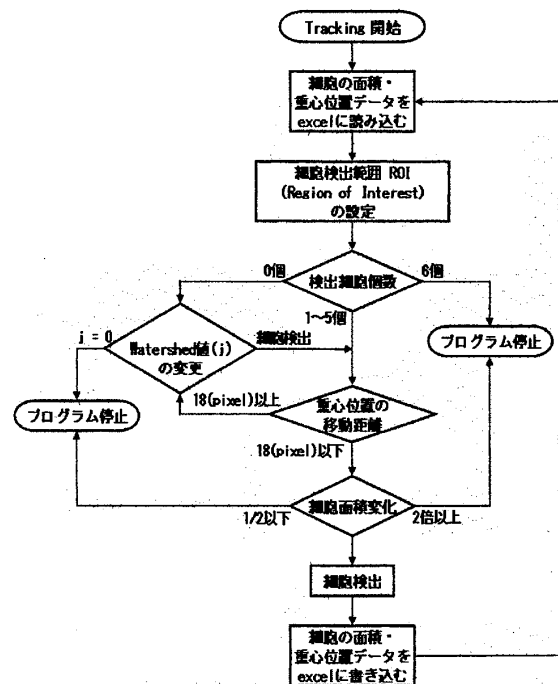


図1. 細胞 Tracking アルゴリズム

3-3 画像解析方法

傷害部位の対称性を考慮し、取得した画像の左上1/4部分を解析対象とした。傷害修復過程の経時変化として、1分毎の画像に対し Watershed 法により領域分割を行い、傷害部位面積・細胞面積の平均・細胞数を得た。

また、傷害直後の画像に存在した 43 個の細胞に対して Tracking を行った結果、10 個の細胞が撮影画像外へ移動すること、11 個の細胞がシャーレから剥離すること、2 個の細胞が分裂することを確認した。さらに、7 時間にわたり Tracking 可能であった 20 個の細胞を対象に、個々の細胞の重心位置、細胞面積データを取得した。個々の細胞に関するデータを基に、20 個の細胞の重心位置の移動や面積変化を経時的に比較することにより、組織学的な解析を試みた。

4. 結果

4-1 傷害修復過程の経時変化

まず、傷害部位の面積変化を図 2 に示す。図 2 より、作成したスクラッチ傷害の面積は、約 3 時間で埋まることが分かる。また、図 3、4 に細胞面積と細胞数の時間変化を示す。傷害部位が埋まるまで細胞面積は増加すること、傷害部位が埋まった後、細胞面積は減少し細胞数は増加することが分かる。

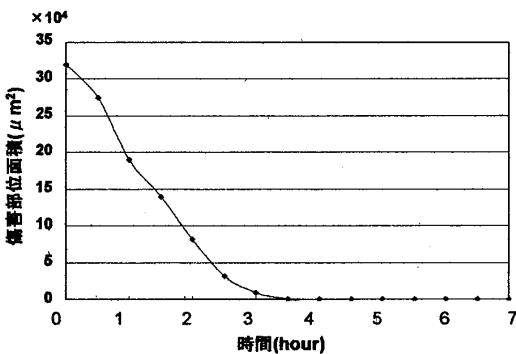


図 2. 傷部位面積変化

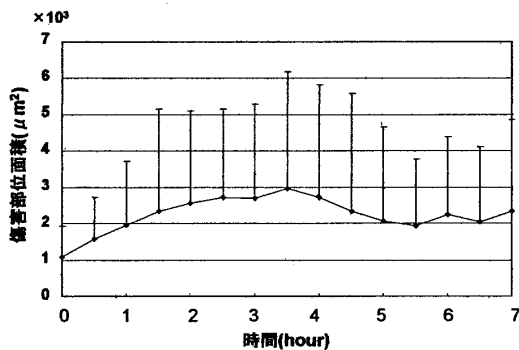


図 3. 細胞面積経時変化

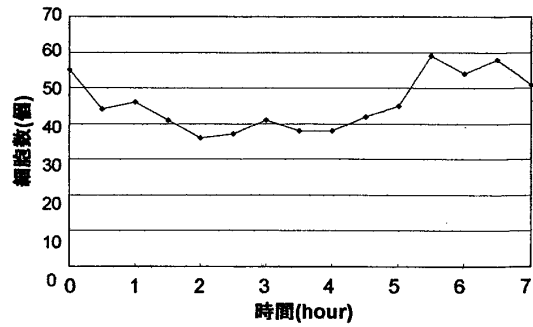


図 4. 細胞個数経時変化

4-2 tracking 結果

20 個の細胞を 7 時間 Tracking し、個々の細胞の重心位置の経時変化を得た。図 5 は傷害直後から 3 時間後、図 6 は傷害後 3~7 時間の細胞の移動経路を示す。傷害直後は、傷害周辺の細胞は傷害中心部へ移動することが分かる。傷害部位が埋まる 3 時間後から 7 時間までは、細胞移動方向に特徴はなくランダムに遊走することが分かる。

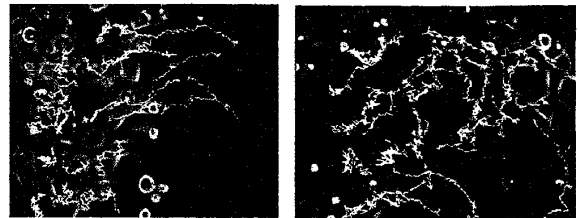


図 5. 移動経路(0-3 hour) 図 6. 移動経路(3-7 hour)

5. まとめ

傷害修復プロセスとして、①まず細胞が成長(拡大)することにより損傷部位が埋まること、②その後細胞面積は徐々に減少すること、が分かった。従って、細胞が互いに接すると、接触阻害により細胞運動・増殖が停止する²⁾ことが確認された。

6. 今後の展望

現時点でも、組織細胞間でのシグナル交換については十分に解明されていない。細胞接触により何らかのシグナルが細胞間で交換されると考えられるが、具体的にどのような物質が介在し、細胞と細胞がどのようなシグナルを出しているかは分かっていない²⁾。今後は、細胞染色によるシグナル物質の特定や高さデータを含む詳細な解析を行う必要がある。

[参考文献]

- 1) Zimmer C, et.al., Segmentation and tracking of migrating cells in videomicroscopy with parametric active contours: a tool for cell-based drug testing, IEEE, 2002.
- 2) Bruce Alberts et.al, Molecular Biology of The Cell Third Edition, Newton Press, 1995.