

# 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

Image Analysis Algorithm for Kinematics and Morphology Measurement of Cells

for the Evaluation of Tissue Construction

0130112 月精智子 太田裕治

Tomoko GESSEI and Yuji OHTA

## 1. 研究背景

人工腎臓のひとつである連続携帯式腹膜透析 (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis, CAPD)は, 社会復帰に有効, 安価であるなど様々なメリットがあり, 患者の QOL(Quality of Life)向上が望まれている日本において, 今後普及が予想される透析療法である. CAPD の合併症の1つに, 腹膜中皮細胞の傷害(剥離・肥厚等)による, 腹膜機能の低下がある. この場合, CAPD 患者は腹膜透析を一時中断しなければならず, 低下した腹膜機能の早期回復を目指した, 細胞修復過程のメカニズム解明が強く望まれている.

一方, 細胞を利用して自己組織の再生や修復, 臓器機能の代替を行う, 組織工学や再生医学の研究が, 近年めざましい進化を遂げている. 様々な組織になり得る未分化な幹細胞を利用した臓器の再生・構築の研究が行われ, 構築した生体組織の臨床応用も一部実現している. 将来的には組織構築に利用される増殖・分化の可能性を有する細胞の研究がますます盛んに行われることが予想される.

一般に, 細胞は単独では機能しておらず, 細胞と細胞, 細胞と細胞外マトリックスとの相互作用により機能を発揮している. また, 細胞は化学物質の濃度勾配により移動する走化性を持っている. これらの細胞が持つ相互作用や性質の解明を目的とした研究を行うために, 培養中の細胞群をデジタル画像として取得し, 画像処理ソフトウェアを用いて解析する方法がある. 領域分割処理機能を有する画像処理ソフトウェアを用いることで, 静止画像中の細胞の境界を抽出し, 個々の細胞の形状特徴を定量化することが可能である. しかし, 個々の細胞における動的な形態変化, 細胞移動量の解析を行う際には, 現在の画像処理ソフトウェアでは不十分である. そのため, ①細胞抽出 ②細胞追跡 ③時間変化情報の取得 ④形状特徴の定量デ

ータ取得, の4つの機能を追加した細胞研究用画像処理ソフトウェアの開発が必要となる.

## 2. 目的

個々の細胞を追跡し, 細胞の形態・運動解析が可能な画像処理アルゴリズムの開発を行う. さらに, 開発したアルゴリズムを用いることで, 腹膜透析における細胞の修復過程メカニズムの解明や構築した生体組織の評価が可能なシステムの確立を目的とする.

## 3. 実験方法

### 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  $\phi 35$  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 (90% 程度) になるまで培養し傷害モデル実験に用いた. 細胞傷害は, ピペットチップ (2-200  $\mu$ l) でスクラッチを作成し, 細胞に機械的ストレスを加えるものとした. この傷害モデル細胞の修復過程を図1に示すように倒立位相差顕微鏡 (IX70, オリンパス社製) にて連続観察した. 培養シャーレは炭酸ガス培養装置 (IX-IBC, オリンパス社製: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内に置き, 細胞画像データは CCD カメラ (HC-300Z/OL, オリンパス社製) にて5分毎に取得した. このように撮影した約1.5日間, 448枚の画像を画像解析に使用した.

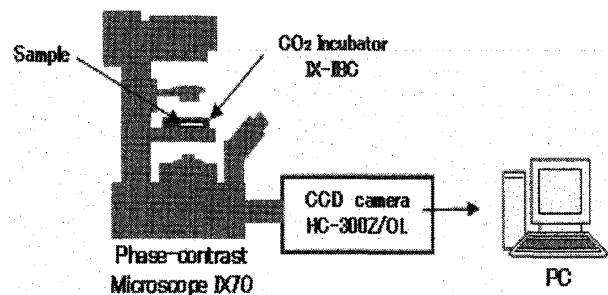


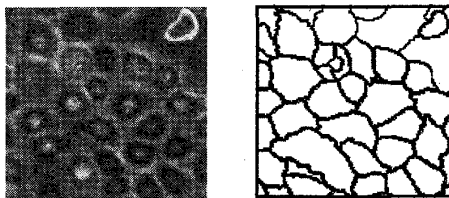
図1 画像解析システム

3-2 アルゴリズム作成, 画像解析方法

撮影画像を PC(personal computer)に取り込み, 8bit グレースケール (256 階調) に変換し, 画像処理を行った. 画像処理ソフト OPTIMAS 6.1 を用い, 前処理として, 平滑化処理ならびに強調処理を施した後, Watershed 法により細胞検出を行った. この一連の作業を OPTIMAS 6.1 の Macro 言語を用いて Tracking アルゴリズムとした.

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. 図 2 に Watershed 法の施行前後の画像を示す.

本研究では長時間の細胞追跡を目的とし, 4 種類のアルゴリズムを作成し, その比較・検証を行った. アルゴリズム作成には, 様々な制御構文やパラメータを使用した. 各々のアルゴリズムの特徴を表 1 に示す. アルゴリズムの検証については, 撮影画像内の任意に選択した 100 個の細胞に対し, 目視確認を行いながら Tracking アルゴリズムの検証を行った.



(a) 施行前 (b) 施行後  
図 2 Watershed 法による細胞検出

表 1 各アルゴリズムの特徴

	特徴
Macro 1	①細胞重心位置情報のみによる細胞検出
Macro 2	①細胞重心位置情報による細胞検出 ②ブランチ構文による Watershed 値設定 ③重心位置のパラメータによる制御
Macro 3	①細胞重心位置情報による細胞検出 ②ループ構文による watershed 値設定 ③重心位置のパラメータによる制御
Macro 4	①細胞重心位置情報による細胞検出 ②ループ構文による watershed 値設定 ③重心位置・面積のパラメータによる制御 ④細胞検出困難な場合の次画像開示

4. 結果および考察

4 種類の細胞 Tracking アルゴリズムを用い, 追跡可能時間を比較した. その結果を表 2 に示す. Tracking 成功率が最も高い Macro 4 を用いた画像解析実験では, 最大で 334 枚 (約 28 時間) の追跡が可能であった. 後者の Macro ほど平均追跡時間が延長する結果であり, 重心位置の移動・面積の情報に基づいた適切な制御構文の構築とパラメータの設定が, 正確かつ長時間の細胞追跡に有効であるといえる.

表 2 Tracking 成功率

追跡画像枚数 (枚)	追跡細胞数 (個)			
	Macro 1	Macro 2	Macro 3	Macro 4
1~20	63	59	37	26
21~40	11	13	12	13
41 以上	26	28	51	61
平均追跡時間 (時間)	2.35 (±2.67)	2.89 (±3.46)	4.91 (±4.86)	5.85 (±5.01)

5. 結論

異なる特徴を持つ 4 種類の細胞 Tracking アルゴリズムを作成し, それらを比較・検証した. その結果, 従来の約 2.5 倍の細胞追跡が可能となった. 今後, 細胞輝度値や細胞検出範囲 (ROI) の情報に基づく制御構文の構築とパラメータの設定を検討し, 時間変化による細胞情報の取得から細胞形態・運動解析を行うアルゴリズムの更なる改良が求められる.

[参考文献]

- 1) Takashi H, et.al., Image analysis of remesothelialization following chemical wounding of cultured human peritoneal mesothelial cells, *Kidney International*, **64**, pp.2280-2290, 2003.
- 2) Llion W. Morgan, et.al., Glucose degradation products (GDP) retard remesothelialization independently of D-glucose concentration, *Kidney Int.*, **64** (5): 1854-66, 2003.