

ヒト生体細胞分析を対象とした画像処理システムの構築

野村 大輔*・久池井 茂・川原 浩治

Development of Cell Function Analysis Technology Employing Image Processing Technology

Daisuke NOMURA, Shigeru KUCHII and Hiroharu KAWAHARA

Abstract

This research has aimed to develop the technique for analyzing various functions in the cell by the images of the fluorescently-stained cells that are acquired with fluorescence microscope and Lumina Vision. The images have a lot of noise and blurring that disturb the estimated amount of antibody. Removing them without losing the original information is an important issue. It is succeeded in developing the effective image processing method with blind deconvolution and Winner filter. This method is capable of restoring blur images. It not only improved to estimate the amount of antibody but also facilitated area extraction. It is considered effective the parameter calculated from fluorescence images because they are opaque whether all cells were stained perfectly and imperfect fluorescently-stained cells disturb estimated amounts of antibody, too. It is showed that high fluorescence cells are closely related to correlation with the amount of antibody and cell images.

Key words : Fluorescently-Stained Cell, Image Processing, Blind Deconvolution

1 はじめに

バイオ技術の発展に伴い、細胞培養を応用した有用物質の生産が可能となっている。抗体もそのような有用物質の1つである。こうした研究、生産の過程において、対象を定量化することは、非常に重要である。しかし、一般的な定量化手法である酵素抗体法 (ELISA 法) は平均6時間程度の分析時間を要するため、大きな負担となっている。また、優れた蛍光試料が開発され、蛍光染色によって細胞を観察および分析する手法は一般的となっている。蛍光プローブは、任意の抗体と結合し、その蛍光量は抗体量と比例すると考えられ、蛍光分析は抗体量分析に対しても有効な手法であるといえる。また、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いれば、3次元空間内の特定位置の輝度を測定することが可能である。

そこで本研究では、蛍光染色を用いた抗体量分析手法を提案し、蛍光画像と酵素抗体法の間にある一定の相関関係を確認した^{1),2)}。また、共焦点顕微鏡画像から、同様に抗体量定量化技術の開発および三次元構造の形成を行った³⁾。しかし、高速性や簡易性を高めることを目的として、蛍光分析法を提案していることから、本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いない2次元画像処理による分析手法の開発を行った。

これまでの研究において、画像のボケやノイズ、細胞と背景部の閾値などが蛍光分析手法の精度に対しての重要な要素であると考え、画像解析手法の改良を行った。また、これまでは細胞中の平均輝度を求め、その標本平均をパラメータとして相関性の検討を行ったが、本研究では、さらにパラメータ設定が相関性に与える影響を考慮し、分析技術の改良を行った。

2 実験方法

本研究では、Bリンパ芽球様細胞株 SK7291 細胞およびパーキットリンパ腫細胞株 Ramos 細胞を FITC 標識試薬によって染色し、TE-300 (Nikon) と Lumina Vision (三谷商事) によって構成されるシステムによって撮影した TIFF 画像を研究対象とした。試料により、細胞中の IgM 抗体を染色しており、蛍光画像は間接的に、この抗体量を示しているといえる。Fig. 1 は、本研究で使用した TE-300 である。FITC 標識試薬は、アミノ基と容易に反応することから、タンパク質、アミノ酸、ペプチドの検出などに広く用いられている。また、IgM 抗体は、抗原に対し一番最初に反応する抗体であり、血液中に含まれている。Fig. 2 は、実験に用いた細胞の蛍光画像である。

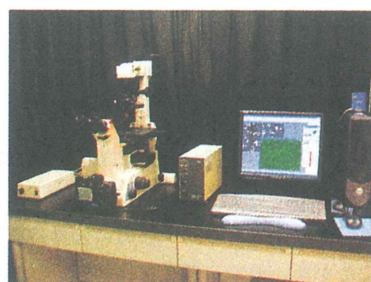


Fig. 1 Fluorescence Microscope (TE-300)

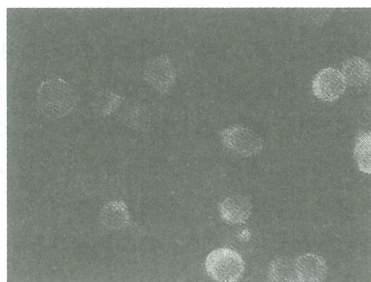


Fig. 2 Fluorescence Cell Image

*専攻科 制御工学専攻2年

3 画像処置

3.1 ウィナーフィルタ

ボケていない原画像 $f(x,y)$, 劣化画像 $c(x,y)$, ボケ関数 $g(x,y)$, ノイズ $n(x,y)$ は式 (3.1) に従い, 劣化画像は原画像とボケ関数の畳み込み積分である。

$$c(x,y) = \iint g(x-tx,y-ty)f(x,y)dtxdty + n(x,y) \quad (3.1)$$

これをフーリエ変換すれば, 式 (3.2) になり, フーリエ領域では各要素を単純に四則演算できるので, 式 (3.3) に変形でき, これを逆フーリエ変換すれば原画像が求まる。

$$C(u,v) = G(u,v)F(u,v) + N(u,v) \quad (3.2)$$

$$F(u,v) = C(u,v)/G(u,v) - N(u,v)/G(u,v) \quad (3.3)$$

ここで同様に, 復元後画像 $f'(x,y)$ は劣化画像 $c(x,y)$ と復元関数 $b(x,y)$ の畳み込み積分であると定義すれば, そのフーリエ変換は式 (3.4) になり, $G(u,v) = 1/B(u,v)$ のとき, 式 (3.5) である。

$$F'(u,v) = \{G(u,v)F(u,v) + N(u,v)\}B(u,v) \quad (3.4)$$

$$F'(u,v) = F(u,v) + N(u,v)/G(u,v) \quad (3.5)$$

これは逆フィルタと呼ばれる回復技術であるが, 正確に第 2 項を決定することは難しく, 無理に回復を行なえば, $G(u,v)$ 内にパワースペクトルの小さな領域において, その位置のノイズが非常に拡大される。また特に 0 をとることがあれば, ノイズは無無限大となる。

ウィナーフィルタ (最小二乗フィルタ) は $f(x,y)$ と $f'(x,y)$ の平均二乗誤差を求め, これを最小にするフィルタである。平均二乗誤差は式 (3.6) で定義され, $E[\cdot]$ は平均化を行なう関数である。このとき, 復元関数のフーリエ変換 $B(u,v)$ は式 (3.7) となる。

$$E[e^2] = E[\{f(x,y) - f'(x,y)\}^2] \quad (3.6)$$

$$B(u,v) = \frac{G^*(u,v)}{|G(u,v)|^2 + (S_n(u,v)/S_f(u,v))} \quad (3.7)$$

ここで, $G^*(u,v)$, $S_n(u,v)$, $S_f(u,v)$ はそれぞれ $G'(u,v)$ の共役複素数, ノイズのパワースペクトル, 原画像のパワースペクトルである。一般的に分母の第二項は不明であることが多いので, 定数を代替し近似的な計算を行うことが多い。

3.2 繰り返し計算とコスト関数による BD 法

BD 法は, 拘束条件として画像の非負生を用いコスト関数を設定し, 繰り返し計算によって, ボケ関数を近似的に求めることが可能である。ブラインドデコンボリューションとは, 二つの未知信号のコンボリューションが与えられているとき, この信号のみから, 二つの未知信号を求めることである。

ブラインドデコンボリューションは, 原画像のサポート条件が得られるとき高い収束性を示すが, 通常与えられない場合がほとんどである。一方, 観測画像 (劣化画像) のサポート条件は容易に得られるものの, 画像内にノイズが発生すると正確なサポート条件を特定できない。

Ayers と Dainty らによって提案された繰り返し型のブラインドデコンボリューション法³⁾は, 物体の非負性などを利用して解を特定する手法である。しかし, 収束性がなく信頼性が低い。さらに, 明確にサポート条件を利用できない場合は, 観測像にノイズが含まれていないときでさえ, 完全解を得ることは少ない。よって, 近年では, 非負性に加えサポート条件を併用することが一般的である。また, この手法でのフーリエエラー EF_m を式 (3.8) として定義することが可能である。

$$EF_m^2 = \sum |C(u,v) - F'(u,v)G'(u,v)|^2 \quad (3.8)$$

Lane は, 繰り返し型のブラインドデコンボリューションが, 不安定性を持つのは, $C(u,v)/G(u,v)$, $C(u,v)/F(u,v)$ のようなフィルタ処理をアルゴリズムの中に取り入れているためであると指摘している。

そこで, Lane はフーリエエラー EF と E_i (式 (3.9)) の和である E_c (式 (3.10)) をコスト関数として利用し, これが低下するように原画像と PSF の推定画像を逐次変化させていく conjugate gradient minimization 法⁴⁾を提案した。

$$E_i^2 = |f(x,y)|^2 + |g(x,y)|^2 \quad (3.9)$$

$$E_c^2 = E_i^2 + EF_m^2 \quad (3.10)$$

これは収束性のある非常に有効な手法である。しかし, コスト関数が実領域とフーリエ領域のエラーの和であるため, コスト関数の極値で停滞しやすく, さらに実領域も原画像と PSF の推定エラーの和であるため, 双方の差が大きいつま, 小さいほうのエラーがコスト関数に反映されにくいといった欠点がある。

これらの手法の長所と短所から, 高域域は繰り返し型の BD 法のフィルタ部分に収束性のある処理を導入するアルゴリズム⁵⁾を提案している。本研究では, 初期推定 PSF としてガウス関数および, 初期推定原画像はランダム関数による非負の値を定義し, この手法によって PSF を求めた。Fig. 3 にこれを示す。



Fig. 3 Point Spread Function

3.3 細胞部抽出

画像から細胞の平均輝度を算出する場合、細胞部のみを抽出する必要がある。画像全体の平均輝度は、細胞中の平均輝度が等しくとも、細胞の個数が増えるほど大きくなるからである。また、異常に面積が小さい細胞や、細胞ではない蛍光体などを除外するためにも、背景部からこれらを抽出し、選別する必要がある。

そこで、ウィナーフィルタを用いて回復した画像より、蛍光体を抽出し、一定の条件を満足する標準細胞のみの平均輝度を算出するプログラムを作成し、データ解析を行った。Fig. 3 に、例として、今回使用した Ramos 細胞画像の処理過程を示す。(a) は撮影した原画像、(b) はウィナーフィルタを使用した画像、(c) は細胞部の領域を抽出した画像、(d) は背景部の画素を全て0にした画像である。画像は、レインボーカラーで表示しており、画素値が大きくなるほど、色が青から赤へと変化する。

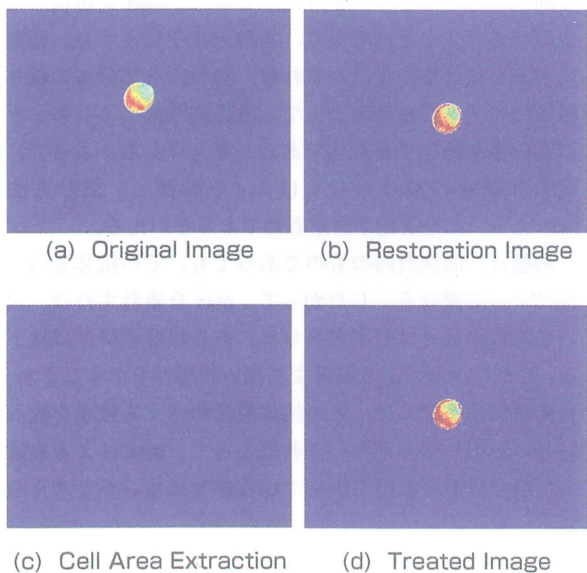


Fig. 4 Process of Cell Treatment

4 パラメータ設定

本研究では画像処理技術に加え、細胞パラメータの決定がどのように、相関性に影響を及ぼすのか検討を行った。各細胞の輝度強度は、同試料内および同画像内でさえ、大きく異なり、これらを単純に平均化したものをパラメータとして用いて良いのか疑問がある。なぜなら、細胞の褪色や染色が全ての細胞において、全く同一ではないと考えられるからである。

細胞のある瞬間を撮影した画像には、かなり褪色が進み蛍光が弱いもの反対に強い蛍光を保ったものなどが混在しているが、この分散があまりに大きい、あるいは一方に偏っている場合は、平均化したものでは高い相関性を得ることが出来ない。また、染色が不十分な細胞の割合が高い場合

も同様に高い相関性が望めない。

そこで、集計方法として、同試料内の輝度パラメータの最大を算出し、比較検討を行った。さらに、輝度パラメータにもこれまでの平均値に最頻値、最大値を加え、考察の幅を拡大した。

最頻値は最大値より20分割し、もっとも輝度が存在する範囲の中央値である。これらは、画像中の1つの細胞から得られるものである。画像中には、複数の標準細胞が撮影されている場合もあり、また1つの試料を20枚程度撮影していることから、試料に対して数十～百の輝度パラメータが得られる。これをさらに平均および最大のデータとして集計し、指標に対応するパラメータとした。

以後本文では、単一細胞の輝度パラメータを(平均値 Ave, 最頻値 Mod, 最大値 Max)とし、集計方法を(平均 ave, 最大 max)として示す。

5 実験結果

以下に、Ramos 細胞および SK7291 細胞の各輝度パラメータと指標の相関係数を示す。Fig. 5 ~ Fig. 10 は各細胞の輝度パラメータと指標の散布図である。Ave、Mod、Max ごとに ave 及び max で集計したものを図中に表示している。直線は一次の最小二乗法による近似線であり、数値は相関係数である。

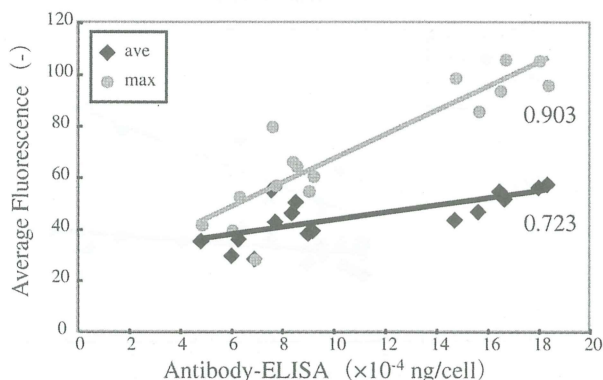


Fig. 5 Correlation Between Average Fluorescence and Antibody (Ramos)

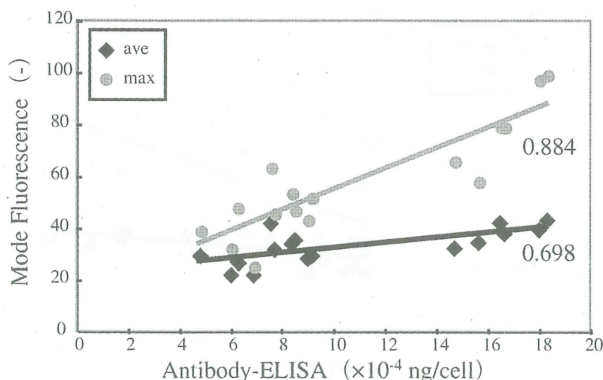


Fig. 6 Correlation Between Mode Fluorescence and Antibody (Ramos)

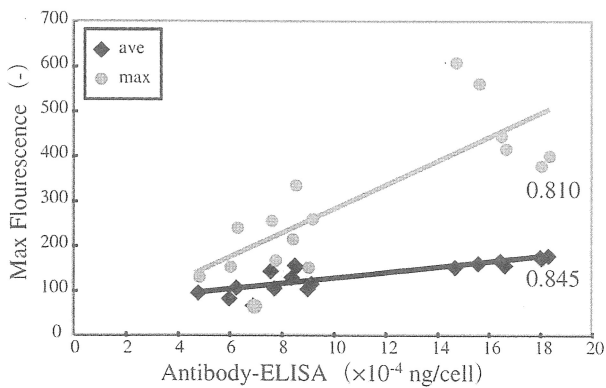


Fig. 7 Correlation Between Max Fluorescence and Antibody(Ramos)

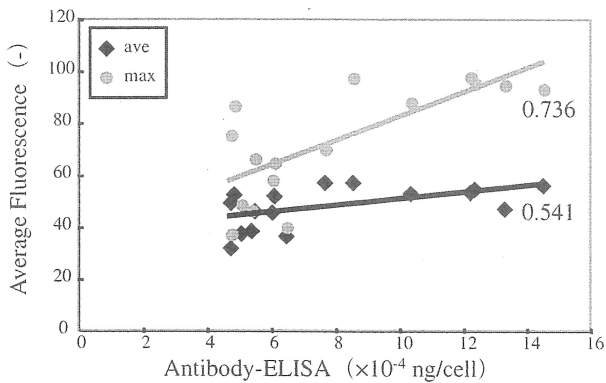


Fig. 8 Correlation Between Average Fluorescence and Antibody(SK)

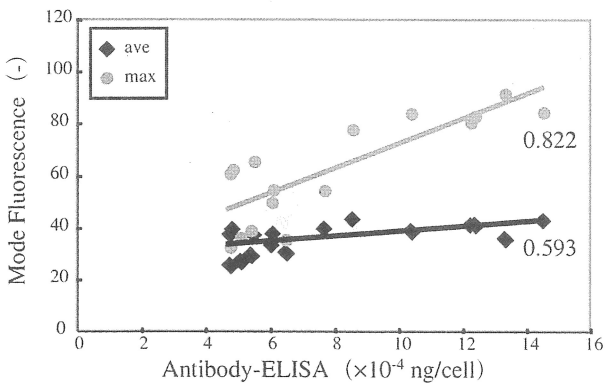


Fig. 9 Correlation Between Mode Fluorescence and Antibody(SK)

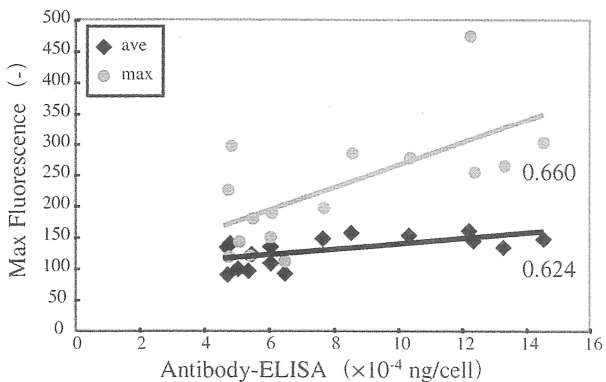


Fig. 10 Correlation Between Max Fluorescence and Antibody(SK)

6 考察とまとめ

本研究では、蛍光画像内輝度パラメータと酵素抗体法による抗体量の間に関連関係があることを示せた。今回、2種類の細胞に対して、同様の実験を行なったが、Ramos細胞の方が、パラメータの選択に関わらず相関係数が高いことがわかった。このことから、細胞ごとに放つ蛍光に固有の特性を持つのではないかと考えられる。

Ramos細胞において、相関係数が最大となったパラメータは、細胞輝度のAveを、maxにより集計したものであり、その相関係数は0.903である。一方、SK7291細胞では、細胞輝度のModを、maxにより集計したものであり、その相関係数は0.822であった。

また、細胞のパラメータとしてAveおよびModを選択したそれぞれの場合に、大きな差はなく、細胞データの集計方法として、aveではなくmaxを用いれば相関性を大きく向上できることがわかった。しかし、Maxを選択した場合は、この二つとは異なり、集計方法を変えても、相関性に大きな差はなかった。これは、細胞内抗体分布の偏りや撮影時のノイズなどによって、画像細胞部にイレギュラーに高い値が発生するためであると考えられる。よって、同試料内細胞のModもしくはAveを計算し、集計方法にmaxを用いた定量化手法が有効であるといえる。

細胞は、同試料内のものであっても、その抗体量は、個体によって異なる。したがって、maxを集計すれば、試料の平均抗体量とは傾向が異なり、ある程度相関性は低下する。しかし、aveによる集計より高い相関性を示すことから、蛍光画像の細胞には、その抗体量に相応する蛍光を放っていないものが多くあり、これによって、maxによる集計をした場合以上の誤差を生んでいるのではないかと考えられる。

参考文献

- 1) 谷下和孝, 久池井茂, 蛍光染色細胞画像における最適定量化手法開発, 日本機械学会講演論文集, No.058-1, 89-90(2005)
- 2) 谷下和孝, 久池井茂, 画像処理技術を用いた蛍光染色細胞の逐次定量化手法の開発, 日本機械学会講演論文集, No.058-2, 109-110 (2005)
- 3) 三好誠, 久池井茂, 3次元化による画像処理技術を用いた細胞機能分析技術の開発, 日本機械学会年次大会講演論文集, Vol.5, No.06-1, 275-276 (2006)
- 4) G. R. Ayers and J. C. Dainty, Iterative blind deconvolution method and its applications, Opt. Lett., Vol.13, 547-549(1988)
- 5) R. G. Lane, Blind deconvolution of speckle image, J. Opt. Soc. Am. A, Vol.9, 1858-1866(1992)
- 6) 高城洋明, 高橋徹, 林明彦, コスト関数と物体の拘束条件とを用いる繰り返し型ブラインドデコンボリューション法, 工学, Vol.31, No.3, 169-175(2002)

(2007年10月12日 受理)