

ビデオ顕微鏡像における細胞抽出に関する考察

笹村ゆかり[†] 長谷山美紀[†] 北島 秀夫[†]

[†] 北海道大学大学院工学研究科

〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目

E-mail: †{sasamura,mikich,kitajima}@media.eng.hokudai.ac.jp

あらまし ビデオ顕微鏡より得られた動画像から、アポトーシス細胞のみを自動抽出する手法を提案する。遺伝子によって制御された細胞死であるアポトーシスは、様々な疾病の発症に深く関わっており、そのメカニズムの解明に関する研究が行われている。細胞の観察にはビデオ顕微鏡を用いているが、その解析方法は目視や簡易なソフトウェアに依存しているのが現状である。提案手法では、アポトーシス細胞の持つ形状の特徴に着眼し形状解析を行い、また、ビデオ顕微鏡像は時系列上連続した動画であることから各フレームの前後関係を考慮した処理を行うことによって、所望の細胞か否かを判定する。これにより、アポトーシス細胞のみを自動抽出することを可能とする。

キーワード アポトーシス, ビデオ顕微鏡, 細胞抽出, 形状解析

A Note on an Extract Method for Apoptotic cell from Videomicroscopy Images

Yukari SASAMURA[†], Miki HASEYAMA[†], and Hideo KITAJIMA[†]

[†] School of Engineering, Hokkaido University

Kita-ku, Kita-13 Nishi-8, Sapporo, 060-8628 Japan

E-mail: †{sasamura,mikich,kitajima}@media.eng.hokudai.ac.jp

Abstract This paper presents an effective method which can automatically extract the apoptotic cells from image sequence obtained by using videomicroscopy. Since apoptosis, which called cell death is well-known to be related with various disease. Therefore, several researchers try to reveal its mechanism. Further, for the purpose they often analyze images acquired in the videomicroscopy, by using simple software or visual recognition. However, even using the software, they have to manually process or check the images, because its performance is not enough for the auto-detection of the apoptotic cells. Thus this paper proposes a method to automatically detect the apoptotic cells, which are based on the inherent features of the images of the apoptotic cells.

Key words apoptotic cell, videomicroscopy, cell extraction, shape analysis

1. ま え が き

現在、癌や AIDS の治療を始めとする医学の分野において、細胞死の一形態であるアポトーシス [1] が注目されている。アポトーシスとは、個体の生命を維持するために遺伝子によって制御された細胞死であり、多細胞生物に備った機能の一つである [2] [3]。アポトーシスの制御破綻は癌や AIDS といった多くの疾患に関わっており、アポトーシスの研究がそれら疾患の治療に向け、新しいアプローチを提供する可能性を秘めていると考えられ、1980 年代よりそのメカニズムの解明に関する研究が行われている [1]。例えば、アポトーシスが異常に抑制されることにより癌や自己免疫疾患が生じ、逆にアポトーシスの過剰

により多くの変性疾患が生じると考えられ、人為的にアポトーシスを制御することにより疾患治療を行う手法の研究が行われている [1]。また、最近では細胞の観察方法としてビデオ顕微鏡が用いられている。ビデオ顕微鏡とは、光学顕微鏡にビデオカメラを取り付けたものであり、これを用いて対象物を微速度撮影することによって観察記録を動画として取得することが可能である。しかしながら、得られた画像の解析方法は目視や簡易なソフトウェアに依存しているのが現状であり、ソフトウェアの脆弱さや、大量のデータ処理の必要性から、労力は多大なものとなっている。そこで本稿では、ビデオ顕微鏡像からアポトーシス細胞のみを自動抽出する手法を提案する。

本文では、まず 2. で本文の解析対象である、ビデオ顕微鏡

像と抽出対象とする細胞の画像の特徴について説明する。次に、3.において、2.で説明した特徴を表現可能な定量値を見出し、それを用いて観察画像より抽出細胞のみを取り出す手法を提案する。4.で提案手法の有効性を検証するために実験を行いその結果を示す。

2. 抽出細胞の特徴及びモデル化

2.1 抽出細胞の特徴

本文が解析対象としている顕微鏡像は、A549(ヒトの肺の癌細胞)にいくつかの酵素を投与し、アポトーシスに至る過程をビデオ顕微鏡で微速度撮影することによって取得した動画 [4] から取り出した静止画であり、以後これを観察画像と呼ぶ。観察画像の例を図1に示す。

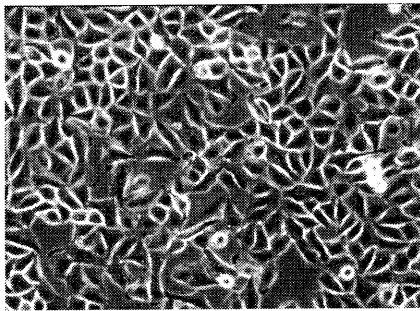


図1 観察画像

また、観察画像におけるアポトーシス細胞(以降、抽出細胞と呼ぶ)の例を図2(a)に示す。抽出細胞は観察画像上で丸みを帯びた形状を示している。ここで、次章で述べる提案手法の導出の際に注目した抽出細胞の特徴を以下にまとめる。

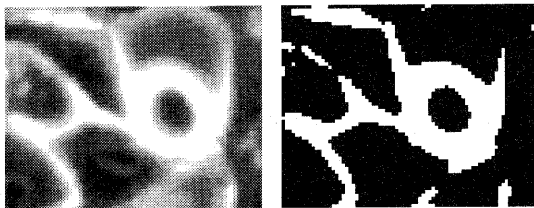
特徴1: 類円形である。

特徴2: 他の細胞と比べて輪郭線が太く輝度値が非常に高い。

特徴3: 抽出細胞は互いに重なっては存在しない。

特徴4: 中心部分は輪郭線部分よりも輝度値が非常に低く、円形である。

これらの特徴に基づいて、次節で抽出細胞のモデル化を行う。



(a) Original

(b) Binary

図2 抽出細胞

2.2 抽出細胞のモデル化

2.1で述べた抽出細胞の特徴より、抽出細胞は輝度値の低い小さな円(半径 R_1) と輝度値の高い大きな円(半径 R_2) を点

(x_0, y_0) を中心として重ねた形状と考えることができ、この特徴を図示すると図3となる。本文では、図3により抽出細胞をモデル化する。

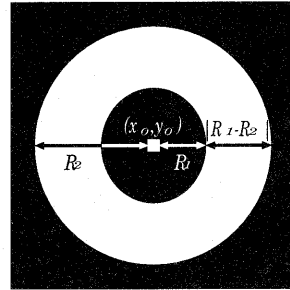


図3 抽出細胞のモデル

3. 提案手法

2.で作成した抽出細胞のモデルに基づいて、観察画像より所望の細胞の抽出を行う。2.で述べた抽出細胞の特徴の中で、特徴1は最も重要である。そこでまず観察画像から、円形状の輪郭線を取り出すことを試みる。輪郭線を取り出すため、閾値処理により、観察画像に2値化を施し、得られた抽出細胞の例を図2(b)に示す。特徴1で述べたように、対象細胞の形状が完全な円ではなく、各所に歪みを持った類円形であることから、そのような円の抽出に有効な Hough 変換 [5] [6] の適用を考える。ところが、抽出細胞に隣接する他の細胞の輪郭が、抽出したい輪郭線の周囲からその外に向かって伸びた突起として存在しており、それが Hough 変換の結果に影響を与え、多くの抽出細胞以外の領域が検出されてしまう。そこで本文では、次の二つの処理により、所望の細胞のみの輪郭線が存在する領域を抽出する。

処理1 観察画像に2値化と細線化を行って得られた画像に円抽出のための Hough 変換を施し円を抽出する。この結果には、上の理由から抽出細胞以外の領域が含まれているので、抽出細胞の特徴1、特徴2及び特徴3に着目し、抽出細胞が存在する可能性がある領域(以降、抽出候補領域)を残し、他は削除する。

処理2 抽出細胞の特徴1及び特徴4に着目し、抽出細胞か否かを判定する。

先に述べたように、特徴1は最も重要な特徴であることから、処理1及び処理2の両方において特徴1に着目し、抽出細胞を精度よく検出する。

以下で各処理について詳しく説明する。

3.1 処理1: 抽出候補領域の限定

抽出細胞の特徴1~3に着目し、観察画像において抽出細胞が存在する可能性の高い領域を限定する。

特徴2を保持する輪郭線を抽出するため、次の処理を行う。観察画像 g (その画素値を $g(i, j)$ とする) を閾値 T_p を用いて2値化した画像 f (その画素値を $f(i, j)$ とする) を次式により得る。

$$f(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{if } g(i, j) \geq T_p \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

次に $f(i, j) = 1$ である画素の領域についてその幅 W が次式を満たす部分のみを $f'(i, j)$ として抽出する。この処理により、輝度値が高く、太い輪郭線のみが抽出される。ただし、 T_w は閾値である。

$$W \geq T_w \quad (2)$$

さらに特徴 1 を満たす輪郭線を抽出するため、 f' に細線化処理を行い、得られた画像に対して Hough 変換を施し、円を抽出する。先に述べた理由で、Hough 変換によって得られた円の中には、多数の抽出細胞ではない領域が含まれている。ここで、特徴 3 に注目し、検出された円の中で、互いに重なって検出された複数の円は、ただ一つの円を残しそれ以外は抽出細胞である可能性が極めて低いと判断し、削除する。重なって抽出される円には 2 種類あると考えられ、一つは複数の円がその一部を互いに共有している場合であり、その例を図 4(a) に示す。もう一つは一方の円が他方の円を完全に包含している場合であり、その例を図 4(b) に示す。互いに重なって得られた円については、Hough 変換の際に得られた投票数が最大であり、かつその最大投票数 V_{max} が式 (3) を満たす閾値 T_v 以上である円のみを残し、それ以外の円を候補から除外する。

$$V_{max} \geq T_v \quad (3)$$

ただし、円を除外する際に、その投票数を残す円の投票数に加えるものとする。図 4(a) では左上の円が、図 4(b) では内側の円がそれぞれ最大投票数 V_{max} を持ち、かつ式 (3) を満たしていると仮定すると、重なって検出されなかった円については、図 4(a) では右下の円が、図 4(b) では外側の円が輪郭線ではないと判断され、候補から除外される。

以上の処理を施し、得られた円の中心座標を (x, y) 、その半径を r とすると、抽出候補領域はその半径を 2 倍とする中心座標 (x, y) 、半径 $2r$ の円で囲まれた領域とする。半径を 2 倍することによって抽出細胞の全体を確実に含んだ領域を抽出できる。図 4(a) より得た抽出候補領域を図 4(c) に、図 4(b) より得た抽出候補領域を図 4(d) にそれぞれ示す。図 4(c) 及び図 4(d) でそれぞれ灰色で示された部分が抽出候補領域である。これより、得られた抽出候補領域内にはそれぞれゼロないし 1 個の抽出細胞を含むことがわかる。

得られた抽出候補領域に対して次節で示す形状解析を行う。

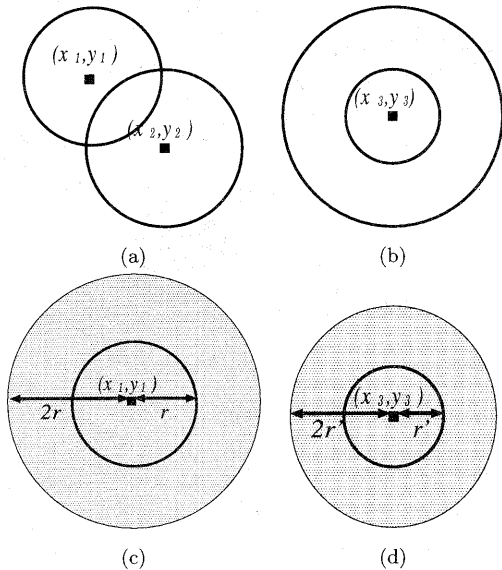


図 4 互いに重なって得られた円の例及び抽出候補領域の取得

3.2 処理 2: 形状解析

2. の特徴 1 で述べているように、抽出細胞は少なくとも細長い形状は呈していない。これは目視で判断する際に非常に重要な特徴となっている。そこで、文献 [7] (注 1) で提案されている、物体の円形度合を表す定量値である形状パラメータ P_f (付録参照) を応用し、形状解析を行う。

提案手法では、観察画像の中の 3.1 で得た抽出候補領域を 2 値化した画像 f において $f(i, j) = 1$ である画素の連結成分を形状解析の対象とし、以後この連結成分を図形と呼ぶ。

文献 [7] で提案されている形状パラメータは、図形の重心を用いて重心の周りに集中した図形か否かを判定するものであり、これを抽出細胞の判定に応用するためには図 3 のモデル図の中心 (x_0, y_0) に相当する抽出細胞の重心、つまり抽出細胞の類円部分のみに注目した場合の重心が必要となる。しかしながら先に述べたように、抽出細胞は類円を示す輪郭線の周囲から外に向かって伸びた突起が存在する形状であり、一般に行なわれる重心の算出法を適用しても中心を正確に求めることは困難である。その例を図 5 に示す。図 5 は図 2(b) における抽出候補領域を拡大した図である。図より、抽出候補領域には抽出細胞の類円部分だけではなく突起部分も含まれていることがわかる。従って、これから重心を算出すると、抽出細胞の重心 (c_i, c_j) ではなくずれた重心が得られる。そこで、形状パラメータ P_f を得るために次節で述べる処理により各抽出候補領域に対して重心 (c_i, c_j) を求める。

(注 1): 文献 [7] では、乳癌の自動診断システムの中で、乳癌の腫瘍陰影は一般的にその形状が類円であることを利用した 2 種類の形状パラメータを用いて形状解析を行い、腫瘍が悪性か良性かを判定している。

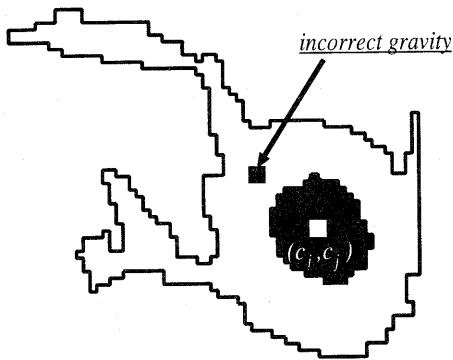


図5 真の重心 (c_i, c_j) とずれた重心

3.2.1 重心 (c_i, c_j) の検出

各抽出候補領域について抽出細胞の類円部分に対する重心 (c_i, c_j) を求める。各抽出候補領域内にはゼロでない1個の抽出細胞が存在することは3.1で述べた。このことから、重心 (c_i, c_j) が得られない抽出候補領域については、抽出細胞が存在する可能性は極めて低いと判断し、除去する。具体的な手順を以下に説明する。

手順1: 抽出候補領域内に存在する画素の中から、次に示す五つの条件を全て満たす画素 (i, j) を選択する。ただし (i, j) を中心とし、半径 r ($0 \leq r \leq R_{max}$) の円周上に存在する画素値が T_p 以上ある画素数を $H_{i,j}(r)$ で表す。また、抽出細胞の大きさから輪郭の存在範囲は、抽出細胞の中心から $R_1 \leq r \leq R_2$ であるとする。

条件1 $R_1 \leq r_{max} \leq R_2$

ただし、 r_{max} は $H_{i,j}(r)$ が最大となる r を示す。

条件2 $H_{i,j}(r_{max}) \geq T_m$

条件3 $H_{i,j}(r_{max}) - M_l \geq T_l$

ただし、 M_l は $0 \leq r \leq R_3$ における $H_{i,j}(r)$ の最小値を示す。

条件4 抽出候補領域に存在する全ての (i', j') について

$$Sub(i, j) \geq Sub(i', j') \quad (4)$$

が成り立つ。

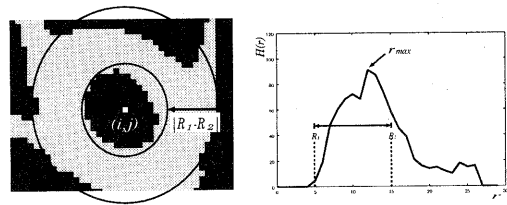
ただし、 $Sub(i, j) \equiv H_{i,j}(r_{max}) - M_r$ であり、 M_r は $R_3 \leq r \leq R_{max}$ における $H_{i,j}(r)$ の最小値を示す。

条件5 $Sub(i, j) \geq T_r$

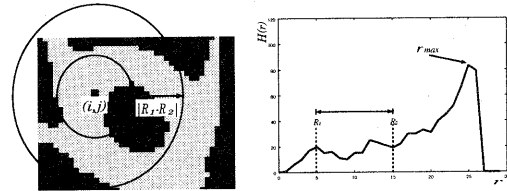
手順2: 条件を満たす (c_i, c_j) が得られない抽出候補領域は、内部に抽出細胞が存在する可能性が極めて低いと判断し、除去する。

ここで、各条件の意味について説明する。

条件1では、点 (i, j) を中心とした図形の分布を観察している。条件1を満たしていない場合、 (i, j) は図6(a)のような抽出細胞の類円部分の中心ではなく、図6(b)に示すようにずれた位置にあると考えられる。



(a) 正しい重心



(b) ずれて推定された重心

図6 (i, j) の位置による $H_{i,j}(r)$ の様子

条件2では抽出細胞ではない図形の重心を候補から除外する。最後に条件3~5では、 (i, j) を重心とした図形の中心部分が、特徴4を満たしているか否かを調べている。

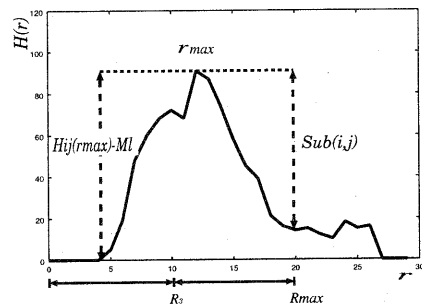


図7 各式の意味

これらの条件では、全て閾値処理を行っているが、条件4の式(4)で抽出候補領域内における $Sub(i, j)$ が最大である画素 (i, j) を選んでいるため、閾値の多少の変化によって、結果が大きく異なる危険性は無い。






得られた重心 (c_i, c_j) を中心とした半径 R_{max} の円で囲まれた領域を新たな抽出候補領域とする。

3.2.2 形状パラメータ

新たに得た抽出候補領域内に存在し、重心 (c_i, c_j) との距離が最小である図形について、 (c_i, c_j) を用いて文献[7]の形状パラメータ P_f を得る。いくつかの図形について P_f の値を調べた結果、表1が得られた。そこで、抽出細胞である図形は式(5)を満たすとする。

$$P_f \leq 1.0 \quad (5)$$

表1 各図形のパラメータ値

	 25	 30	 30	 15	 15
<i>Sf</i>	0.26	0.84	0.94	0.16	0.25
<i>Ef</i>	0.77	0.98	0.49	0.00	0.00
<i>Pf</i>	0.816	1.29	1.06	0.16	0.25

3.3 誤検出の除去

観察画像に 3.1, 3.2 で述べた提案手法を施し, 得られた抽出結果 (以降, 結果画像と呼ぶ) には抽出細胞ではない図形 (以降, 誤検出と呼ぶ) も含まれている. これは 2. で述べたように, 観察画像は時間的な連続性を持つ動画より取り出した静止画であることから, 注目している結果画像だけでなく, 時系列上に並べられた前後の結果画像についても同時に調べることにより, 誤検出を除去することが可能であると考え, 過剰検出を許したためである. 抽出細胞は, 発生してから消滅するまで最短で4フレーム, 最長で16フレーム必要としており, その間 $M \times M$ のマスクの範囲を移動する. そこで, 注目している結果画像を時系列上で $Image_t$ とし, $Image_{t-3}$ から $Image_{t+3}$ までを参照することによって, $Image_t$ で検出された図形が真に抽出細胞か誤検出かを判断する. 具体的な手順を以下に示す.

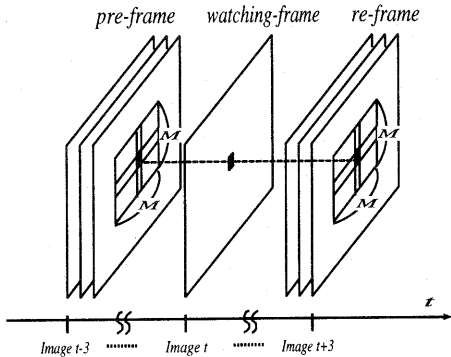


図8 前後の抽出結果を考慮することによる抽出細胞の判定

- 手順1: $Image_t$ 上の図形の重心 (c_i, c_j) を注目画素とした $M \times M$ のマスク内を, $Image_{t-3}$ から $Image_{t+3}$ までについて, 図形が存在するかそれぞれ調べる.
- 手順2: $Image_t$ を含めた, 連続した4フレーム以上の画像における $M \times M$ のマスク内に図形が確認出来なかった場合, 重心 (c_i, c_j) を持つ $Image_t$ 上の図形は抽出細胞である可能性は極めて低いと判断し, 除去する.

以上, 提案手法における処理の概要を図 3.3 に示す. 10(c) に示す.

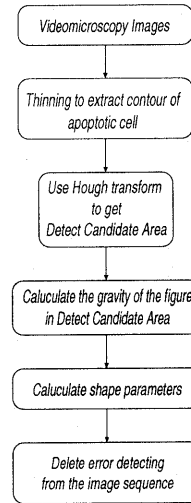


図9 提案手法の概要

4. 実験

4.1 実験条件

解析に用いた観察画像は 2. で説明したビデオ顕微鏡像 (624 × 480 画素 8bit 濃淡画像) であり, A549(ヒトの肺の癌腫瘍) に 5ng/ml の $TNF-\alpha$ (腫瘍破壊因子) を反応させ, 細胞の動向をわかりやすくするために発光酵素であるルシフェラーゼ (生物の体内で発光を促す触媒の働きを行うタンパク質) を投与した様子を1時間ごとに12フレームの間隔で微速度撮影したものである. また, 各閾値は $T_p = 0.78G$ (G は最大画素値), $T_m = 50$, $T_l = 30$, $T_r = 40$, $R_{max} = 20$, $R_1 = 5$, $R_2 = 15$, $R_3 = 10$, $M = 9$ とする.

4.2 実験結果及び考察

微速度撮影したビデオ顕微鏡像から取得した観察画像に 3.1, 3.2 で述べた手法を施した結果を図 10(b) に示す. 他の 319 フレーム全てについても同様の結果が得られ, 誤検出は全フレームを通して 20% 未満であった. さらに, 得られた結果に対して 3.3 で述べた手法を施し誤検出を除去した結果を図 10(c) に示す. このようにして最終的に得られた結果では各フレームとも誤検出は 10% 未満であった.

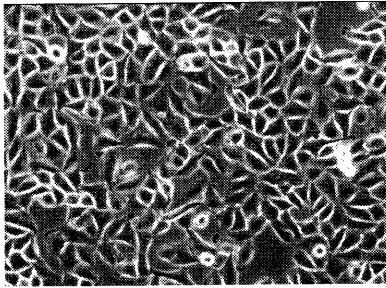
5. まとめ

本稿では, A549 に $TNF-\alpha$ を投与した様子をビデオ顕微鏡で微速度撮影して得た動画像から, アポトーシス細胞のみを自動抽出する手法を提案した. これにより, 所望の細胞全てを抽出することが可能となった. また, 観察画像を1枚の静止画として扱い, 提案手法を施して得られた抽出結果には全フレームを通して 20% の誤検出が認められ, さらに観察画像を動画として扱い, 各フレームの前後関係を考慮することによって, 最終的に得られた結果では, 誤検出は 10% であり, 本手法の有効性が確認出来る.

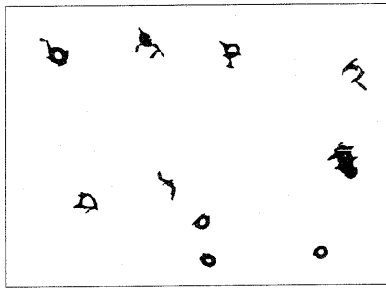
今後はさらに誤検出を減少させるために各種閾値の設定方法

について検討する予定である。

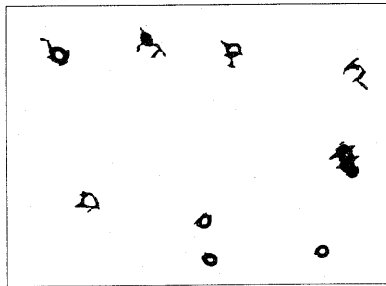
謝辞 本研究を進めるにあたり、ビデオ顕微鏡像を提供して頂き、また有用な御助言を与えて頂いた、Matjaz Barboric 氏 (University of California San Francisco) に深く感謝する。



(a) 観察画像



(b) 3.1 及び 3.2 の処理を施した結果



(c) 最終的な抽出結果

図 10 抽出結果

文 献

- [1] 長田重一, 山本雅, 細胞の誕生と死. 共立出版, 2001.
- [2] 田沼靖一 (編), “アポトーシスと医学”. 羊土社, 1998.
- [3] 田沼靖一 (編), “アポトーシスがわかる”. 羊土社, 2001.
- [4] M. Barboric, S. Kanazawa, and B. Peterlin, “Nf- κ b binds p-tefb to stimulate transcriptional elongation by rna polymerase ii,” *Molecular Cell*, vol. 8, pp. 327-337, August 2001.
- [5] R. O. Duda and P. E. Hart, “Use of the hough transformation to detect lines and curves in pictures,” *Communications of the ACM*, vol. 15, pp. 11-15, January 1972.
- [6] S. Sakane and H. Tamura, “An overview of image processing algorithms: part 3 -Edge and line detection-,” *Bulletin of the Electrotechnical Laboratory*, vol. 44, no. 7,8, pp. 56-75, 1980.
- [7] H.-R. Jin and H. Kobatake, “Automatic detection of malignant tumors on mammograms,” *IEICE*, vol. J76-D-II, pp. 288-295, Feb. 1993.

付 録

形状パラメータ

提案手法において抽出細胞の形状解析を行う際に用いる形状パラメータ [7] について説明する。

形状パラメータには 2 種類あり、一方は重心の周りにどのような図形が分布するかを示す *Spreadness*、もう一方は細長い形状であるかどうかを示す *Elongation* である。それぞれは次のように定義される。

- *Spreadness*:

$$S_f = \frac{(m_{20} + m_{02})}{A^2} \quad (6)$$

- *Elongation*:

$$E_f = \frac{\{m_{11}^2 + (m_{20} - m_{02})^2\}^{\frac{1}{2}}}{(m_{20} + m_{02})} \quad (7)$$

ここで、

$$m_{20} = \sum_i^X \sum_j^Y f(i, j)(i - i_0)^2$$

$$m_{11} = \sum_i^X \sum_j^Y f(i, j)(i - i_0)(j - j_0)$$

$$m_{02} = \sum_i^X \sum_j^Y f(i, j)(j - j_0)^2$$

$$i_0 = (1/A) \sum_i^X \sum_j^Y if(i, j)$$

$$j_0 = (1/A) \sum_i^X \sum_j^Y jf(i, j)$$

$f(i, j)$ は 2 値画像の画素値であり、 X と Y は画像サイズを示す。 A は対象図形の面積であり、 (i_0, j_0) はその重心、 m_{20} 、 m_{11} 、 m_{02} はそれぞれ重心周りの 2 次モーメントである。文献 [7] によると、 S_f は 0.15 から無限大まで、 E_f は 0.0 から 1.0 までの変域をそれぞれ持ち、両者の値の変化は一般に同一傾向を示し、値が小さければその図形は重心の周りに集中していると述べられている。しかし、形状によっては一方が小さい値を示し、もう一方が比較的大きな値を示す場合があるため、両者を併用する事により信頼性を高め、

$$P_f = \sqrt{S_f^2 + E_f^2} \quad (8)$$

を評価パラメータとしている。