

## 2V-4 共焦点レーザー顕微鏡画像からの脳神経の三次元形態解析

佐藤 康平<sup>†</sup> 青木 義満<sup>†</sup> 俣賀 宣子<sup>‡</sup> Takao K. HENSCH<sup>‡</sup>  
 芝浦工業大学工学部情報工学科<sup>†</sup> 理化学研究所脳科学研究センター<sup>‡</sup>

### 1. 研究背景と目的

現在、脳神経科学の分野において、脳神経の構造・機能の解析は「脳を知る」ための重要な課題となっており、多方面から基礎的研究が行なわれている。撮像系と画像処理技術の発展により、脳神経の微細構造を経時的あるいは立体的に可視化し、計測することが求められている。現状では、共焦点レーザー顕微鏡により脳神経の3次元画像を取得することが可能となったが、その画像から脳神経の微細構造を高精度に3次元で計測し、形態により分類するまでには至っていない。そのため、多くの場合、脳神経の研究者が膨大な量の2次元、3次元画像に対して手作業により解析を行っているのが現状である。

本研究では神経細胞のマクロ・ミクロな形態を認識し、必要な3次元計測とスパインの機能の分類を自動処理により実現するシステムの開発を目的としている。特に、従来も行われていた神経組織のマクロな3次元構造の解析のみならず、ニューロンに付随するスパインの形状解析と分類に焦点を当てる。スパインの形態と機能の解析は脳神経の成長過程を解明するための重要な指標として知られている。

### 2. 処理の流れ

処理の流れを図1に示す。スパインの位置を特定するため、断層画像上での2次元的な画像処理と、特定した位置からスパインの形状を正確に把握するためのボリュームデータを対象とした3次元画像処理を組み合わせ適用する。

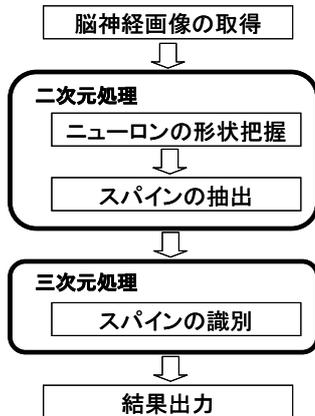


図1. 処理の流れ

Automatic analysis for neuron by confocal laser scanning microscope

<sup>†</sup>Kouhei Satou, Aoki Yoshimitu (Department of Information Science and Engineering, Shibaura Institute of Technology)

<sup>‡</sup>Nobuko Mataga Takao K.HENSCH (NEURONAL CIRCUIT DEVELOPMENT BRAIN SCIENCE INSTITUTE)

### 3. 研究手法

#### (1) 脳神経画像の取得

脳神経を実験用マウスから採得する。スライス状にしたマウスの脳の切片を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像する。合焦点面を軸にz軸方向に0.3ミクロン間隔で撮像を行い、脳神経の断層画像列(30~50枚)を取得する。断層画像列をボリュームレンダリングし、図2のような3次元画像を構築する。ニューロンに付随する微細な突起がスパインであり、図3のようにその形態により3種類に分類される。

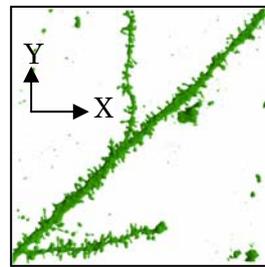


図2. 脳神経3次元画像

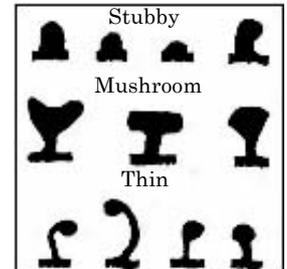


図3. スパイン形状

#### (2) 2次元処理

まず、3次元画像化したニューロンをz軸方向よりシルエット投影した2次元画像を対象に、用いて、スパインの位置特定を行う。

##### ①ニューロンの形状把握

まず、2値化により、画像中からニューロンの存在領域のみを抽出する。ここでは、モード法によって閾値を自動決定した上で2値化を施し、背景からニューロンを分離する。その後、抽出したニューロン領域に対して境界線追跡処理を行い、ニューロンと背景の境界線を抽出する(図4)。

次に、境界線内の領域に対して、細線化処理を施してニューロンの樹状構造を把握する(図5)。細線化した際の線セグメントの端点がスパインの位置と推定できる。境界追跡の結果と細線化の結果を統合した処理結果を図6に示す。

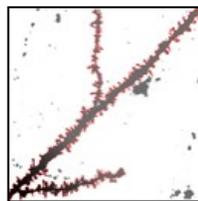


図4. 境界追跡

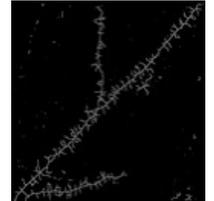


図5. 細線化



図6. 統合結果

## ②スパインの抽出

次に①で得たスパインの端点から、スパインの存在領域を推定する。各端点から後述の方法により探索を行い、ニューロンから各スパインの領域のみを切り出す。端点は細線化により縮小されており、本来のスパインの先端位置にならないため、細線化された線セグメントに対し、逆方向に向かって探索を行い、境界と交わる点をスパインの先端とした。(図7-(a)の丸で囲った部分)。具体的には、各スパインに対し、以下のような処理を行い終了した地点までをスパインの存在領域とする。

- (1) 先端から先端と端点を結ぶ直線に対する垂線方向に対して輪郭までの長さを測る。
- (2) 先端から端点まで、先端と端点を結ぶ直線を移動しながら(1)の処理を繰り返す。(図7-(b))
- (3) 端点からは、細線化した芯との垂線方向に対して輪郭までの長さを測る。(図7-(c)A)
- (4) 細線化した芯を1ピクセルずつ移動して(3)の処理を繰り返す。(図7-(c)B)
- (5) カウント数が1ピクセル前よりもある一定値以上超える場合、探索を終了する。(図7-(d)この場合DがCよりも一定値以上長いので終了)

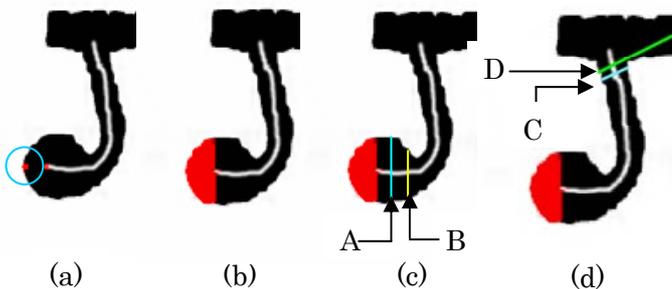


図7. スパインの抽出条件

取得した2次元のスパインの領域を断層画像一枚ずつと比較し、その領域に一定以上の輝度値を持つ画像を取得する。各断層画像間の距離は既知であるため、スパイン領域のz座標を推定できる。

### (3) 3次元処理

以上の処理により、投影画像上でスパインの端点及び3次元位置を推定する。続いて、②で求めたスパインの位置を用いて、3次元ボリュームデータ中からスパインを抜き出し、識別のための形状特徴量を抽出する。スパインは大別すると図3のようにThin、Stubby、Mushroomの3種類がある。この3種を識別するための特徴量としては、スパイン先端部分(ヘッド)とニューロンとの付け根部分の円周長の比を使用する。詳細な判断基準はユーザによって異なる。

それに対応するため、簡易なインタフェースによって3種類のスパインを識別するためのパラメータを入力し、識別のためのテンプレートを作成、識別に利用する。

## 4. 実験及び評価

実験用マウスより512×512の解像度で31枚の断層画像列からなる脳神経画像を対象に、解析した。3次元画像上でのスパインの抽出結果を図8に示す。なお、専門家による目視により、計数したスパインの数と本システムにより計数したスパインの個数を比較したところ90%以上の精度でスパインを取得できた。

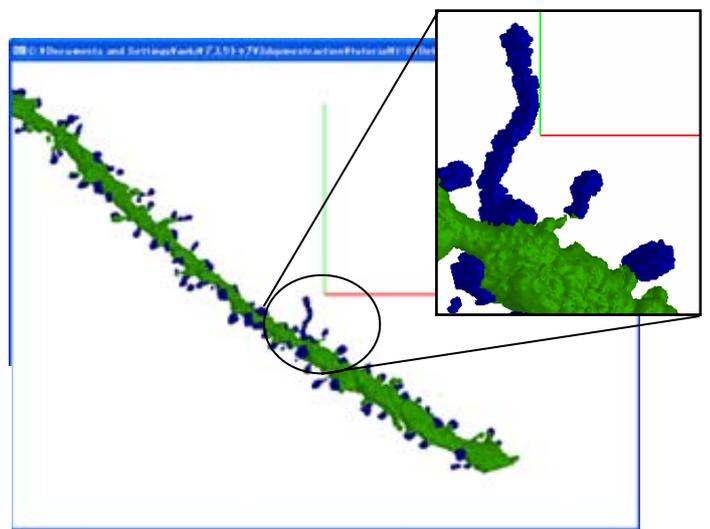


図8. 抽出結果

## 5. まとめ・今後の課題

共焦点レーザー顕微鏡で取得した脳神経画像を対象に、2次元と3次元画像処理を併用した形態解析システムを構築した。スパインの位置推定を投影画像上で行い、識別のための形状特徴量を3次元画像から取得した。

今後は、スパインの抽出精度を向上させるとともに、識別部分についての処理の完成と性能評価を行い、解析システムとして完成度を高めていく。

### 参考文献

- [1] 四方秀則、殷志明、朴鎔燮、北岡裕子、佐藤嘉伸、上甲剛、中村仁信、田村進一 『肺の非剛体レジストレーションのための血管分岐点位置決めアルゴリズム』 電子情報通信学会論文誌, Vol.J85-D-II, No.10, pp.1613-1623, 2002
- [2] 伊藤 厚史、橋本 周司, “コンクリート表面に発生するひび割れの画像計測,” 第14回外観検査の自動化ワークショップ, 講演論文集, pp.61-66 (2002).