

網膜の光学顕微鏡写真からの 細胞像抽出法に関する検討

横山 清子 太田 郁也 渡辺 與作 高田 和之

豊田工業高等専門学校

生物学の分野で重要な研究テーマの一つである；多数の神経細胞の形態解析を行うために利用する細胞画像データベースの作成を容易に行うため、光学顕微鏡写真からの細胞像の自動抽出法の検討を試みた。画面の2値化のための閾値の決定法として濃淡ヒストグラムを用いるのではなく、画面の濃淡値の平均値、標準偏差等を用いて良好な結果が得られた。次に、細胞体と主樹状突起は染色のコントラストが異なるため画面を領域分割し領域毎にその平均値、標準偏差を用いた閾値を決定する方法が適していることを確かめた。さらに、人が処理した結果を他の細胞の自動抽出へ応用できる可能性も検討した。

Examination of Thresholding Method Using Optical Microscopic
Image of Retinal Neuron

Kiyoko Yokoyama, Ikuya Ohota, Yosaku Watanabe, Kazuyuki Takata

Toyota College of Technology

To construct the image database storing large number of neurons, it is need to detect neurons from optical microscopic image automatically. In this paper, thresholding methods were examined using optical microscopic image of catfish retinal neurons. The threshold determined using average, standard deviation and minimal value of image was appropriate. Soma and principal dendrites are different from its gray level. So separating image with small region and different thresholds were determined each region. This method was useful for the images of neuron dyed methylen blue.

1 はしがき

生物学の分野においては、多数の細胞像を対象とした形態解析、形態と機能の関連の解析は重要な研究テーマである。これらの解析は多数の細胞画像を保存し、計算機を用いて客観的な定量解析を行う必要がある。しかし、細胞画像を多数保存する画像データベースの作成には非常な労力がかかること、計算機による形態解析の手法が体系的に確立されていない等の理由により多数の細胞像を対象とした形態解析の例は少ない。このような研究が頻繁に行われるようになれば従来のような1つの細胞の形態を詳細に解析する研究では得られなかった新しい知見が得られることが期待できる。

光学顕微鏡写真は、染色方法にも依存するが対象物と背景とのコントラストが低く、光学的ノイズも多く含み、細胞像以外の細胞と同程度の明るさの対象物も多く含む。従来、細胞像抽出はライトペン、マウスでその輪郭線をトレースしたり、画面を小領域に分割し領域毎に異なる閾値を対話型で設定する等手動もしくは半自動でかなり労力のかかる手法で行ってきた^{(1)・(2)・(3)}。筆者らは約1500個のナマズ網膜神経節細胞を保存する細胞画像データベースを作成したが⁽⁴⁾、作成時の1つの細胞像の取り込み時間は対話型処理で15~20分であった。

本稿では、細胞画像データベースの作成を容易に行うために光学顕微鏡写真から細胞像を自動抽出するための画面の2値化のための閾値の決定方法の検討結果を述べる。画面の2値化の閾値の決定法としては、モード法等画面の濃淡値のヒストグラムを利用する方法が用いられてきている。しかし、今回対象とした画像は次章で述べるようにヒストグラムから閾値を決定するのは困難であった。そこで、閾値の決定には、画面の濃淡値の平均値、標準偏差値、最低値等を用いる方法、画面を自動で小領域に分割し、領域内の平均値、標準偏差等を利用し領域毎に閾値を変化させる方法、人が対話型で正確に細胞像を抽出し、そのときの閾値の決定のし方を参照する方法を検討した。画面の平均値、標準偏差等を参照して閾値を決定する方法は余り例を見ないが、これらは容易に求め

ることができるため、ヒストグラムから2つのピークの谷の値を判読する等より計算が簡単で、細胞像の自動抽出に適している。また、人が正確に処理した結果を利用し、他の細胞を正確に自動抽出できれば人の処理結果を知識ベースとして保存し、これを利用した細胞画像抽出のためのエキスパートシステムを設計することもできる。

以下、2章では生物学的背景、3章では閾値の決定方法、4章では実際の顕微鏡写真を用いて検討した結果を述べる。

2 生物学的背景

2.1 多数の細胞を対象とした形態解析例

神経細胞形態の解析例として、まず、異種生物間の細胞形態の比較がある。その例としては、ラットとサルを対象として同一部位の神経細胞で特定アミノ酸を有する細胞の大きさの分布の比較⁽⁵⁾、コウモリ、ラット及びブタに関し脳の神経細胞を対象として細胞内染色を施し、形態分類を行い、グループ分けされた細胞の存在位置や個数の比較⁽⁶⁾、ブタとウサギの神経細胞の細胞体及び樹状突起に関する形状、細胞の存在位置、核の大きさの比較等⁽⁷⁾がある。次に、生物の成長に伴う細胞形態の変化の解析がある。その例としては、ネコを対象として神経細胞の樹状突起の数、長さ、終端点や分岐点の個数、太さ、細胞体の大きさの変化⁽⁸⁾、カエルとオタマジャクシを対象とした網膜細胞の軸索の有無、長さの変化の解析⁽⁹⁾、ラットの成長に伴う神経細胞の細胞体、樹状突起の形状の変化⁽¹⁰⁾を解析したもの等がある。さらに、ある生物の同一部位細胞の形態分類、統計解析を行ったものとして、ナマズ網膜の神経節細胞の形態分類⁽¹¹⁾、キンギョの網膜の神経節細胞の樹状突起パターンに基づく形態分類⁽¹²⁾、ネコ、ネズミの神経節細胞の細胞体の面積、樹状突起の太さに基づく分類⁽¹³⁾等がある。これらの解析を更に発展させるためには細胞画像データベースを作成し、利用して形態解析を計算機を用いて行うことが必要である。

2.2 対象画像

3 閾値の決定方法

3.1 画面全体を1つの閾値で2値化する方法

濃淡画像から対象物を2値化により抽出するための閾値の決定法としては濃淡値のヒストグラムの2つのピーク間の谷の値を用いるモード法が提案されている。図1(b)に今回対象とした細胞画像の濃淡ヒストグラムを示すが、形状は双峰性ではなくモード法で閾値を決定することは困難である。また、画面のテクスチャー等の性質の類似する領域毎にクラスタリングで分類する方法もあるが、今回の画像は異なるテクスチャー部分から構成されるわけではないのでこの方法も適用できない(14)。

ここでは、画面の濃淡値の平均値、標準偏差、最低値から2値化の閾値を決定する方法を検討した。これらに着目した理由は、まず、対象物である細胞は濃淡画像では黒く染まっており、背景はそれと比較して明るい。従って、例えば最低値は細胞の濃淡値に依存する。また、背景とのコントラストが高く、背景に含まれる細胞以外で染色されている物体が少ない画像は小さい閾値で2値化でき、これは標準偏差に反映される。次に、標準偏差、最低値は簡単に求められるため、濃淡ヒストグラムの形状を自動認識して閾値を決定したり、クラスタリングを行うことと比較して、今回の目的である細胞画像の自動認識ということにより適している。

まず、比較検討した方法は以下の2種類である。

1) 平均値 - x * 標準偏差
($x = 0, 0.5, 1$)

2) 最低値 + y
($y = 5, 10, 15$)

次に、人が画面を見ながら対話型で2値化した場合の閾値を調べ、その値の近似式を求めた。閾値は、

$$\text{最低値} + (\text{平均値} - \text{最低値}) / 2 \quad (1)$$

とした。

今回対象とした細胞像は、ナマズの網膜の神経節細胞である。網膜はメチレンブルー法で染色し、60倍の光学顕微鏡像とした。この像を写真に写した。これをパソコン用ビデオディジタイザ(エー・ディー・エス製)で解像度256*256、濃淡レベル6ビット(64レベル)で標本化した。図1(a)は今回対象とした画像の例である。この染色方法は樹状突起の複雑な枝分かれ部分まで染色できないので、自動抽出の対象としたのは画面中央の丸く膨らんだ細胞体と細胞体から直接伸びている数本の太い主樹状突起の細胞体に近い部分とした。

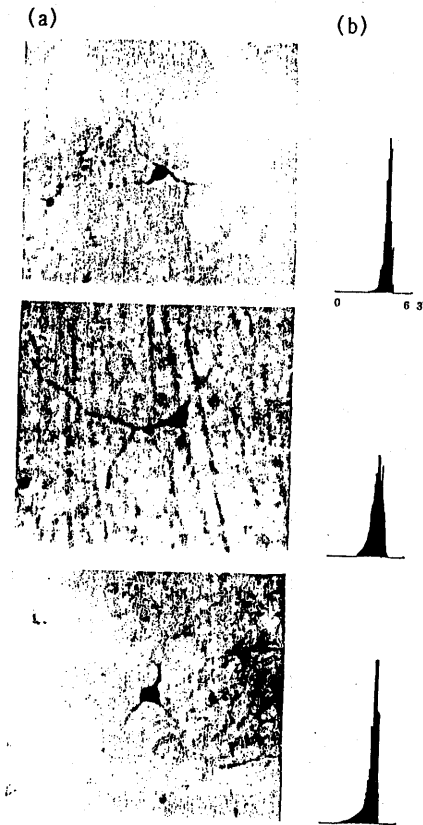


図1 ナマズ網膜神経節細胞像とその濃淡ヒストグラムの例

(a) 神経節細胞の細胞体と主樹状突起

(b) 画面の濃淡ヒストグラム

3.2 画面を領域分割して閾値を決定する方法

対象とした光学顕微鏡写真の場合、細胞体と樹状突起では染色の濃淡値に相違があり細胞体は暗く、樹状突起はそれより明るくなっている。従って、3.1のように全画面同一の閾値とすると、細胞体を正確に2値化し背景のアーチファクトを除去するための閾値では樹状突起が切断する可能性がある。逆に樹状突起をできるだけ長く正確に抽出する閾値では細胞体が実際より大きくなったり、背景のアーチファクトが多く2値化されてしまい、これらと細胞像との分離が不可能となる傾向がある。

そこで、画面を小領域に分割し、その窓内の濃淡値の平均値、標準偏差値を用いて閾値を変化させていく以下の3つの方法を検討した。

1) 画面を16*16の窓に分割し、窓を画面左上から走査し、図2に示すように窓内の標準偏差が画面全体の標準偏差値より高い場合は、窓内に対象物の輪郭線を含むと仮定し、閾値を、窓内の最低値+x (x=8, 10)とした。標準偏差が低い部分は背景上か、対象物上と仮定しその平均値が画面の平均値より高い場合背景と考え窓内全体を63(白)とした。平均値が低い場合対象物を多く含むと考え窓内の最低値+10で2値化した。

2) 人が画面を見ながら画面を小領域に分割し、対話型で閾値を決定した結果を参照して、図3に示す閾値の決定基準を定めた。大きさ6*6の窓を走査させて、窓内の平均値-10より画素値が大きい場合は63(白)とした。細胞体の中に窓が入ってしまう場合を窓内の標準偏差が画面のそれより小さく、画面の平均値から標準偏差を引いた値より窓内の平均値が大きいと仮定し、閾値を窓

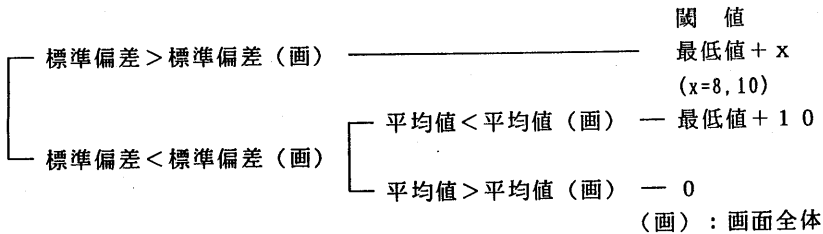


図2 16*16の窓を用いた画面の2値化の閾値の決定方法

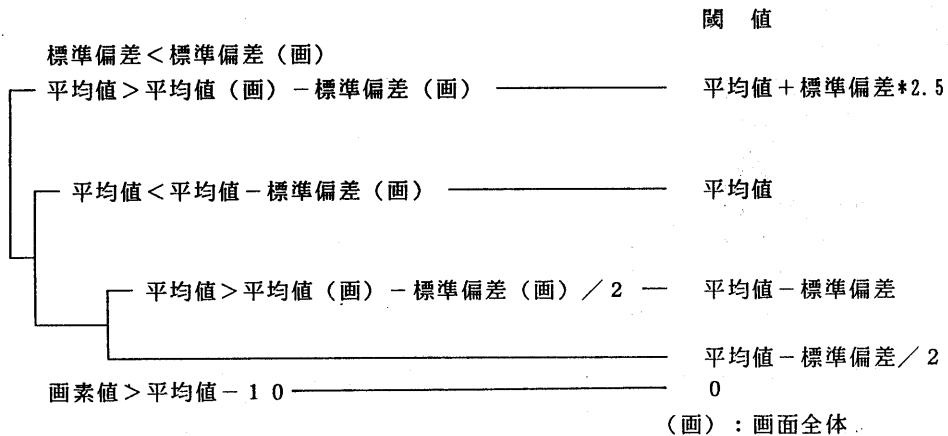


図3 6*6の窓を用いた画面の2値化の閾値の決定方法

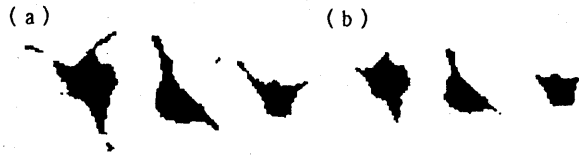


図5 閾値を

(a) $\text{最低値} + (\text{平均値} - \text{最低値}) / 2$ (b) $\text{最低値} + 10$ として2値化した例

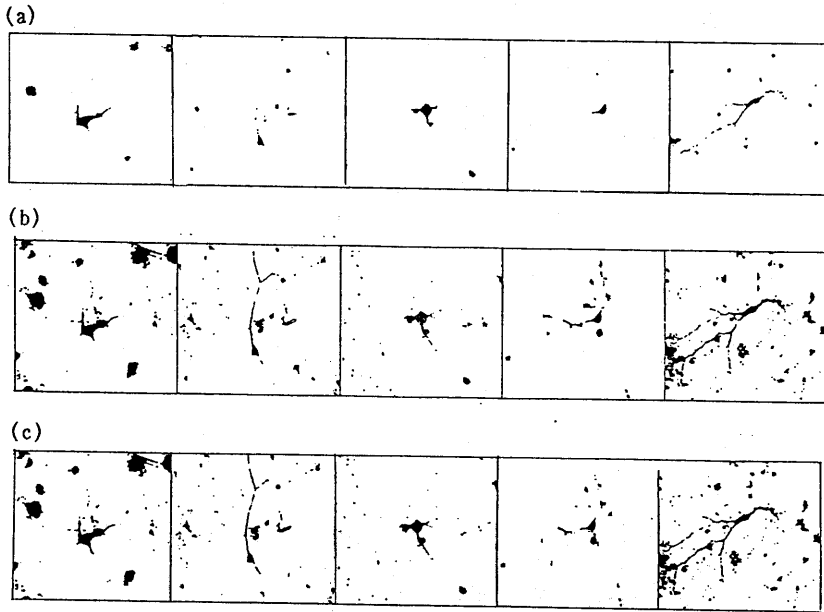


図6 16*16の窓による画面の2値化の例. 窓内の標準偏差が画面の標準偏差より大きい場合の閾値を

(a) $\text{最低値} + 10$ (b) $\text{最低値} + 8$ (c) $\text{最低値} + 10$ とし、
窓の移動を

(a), (b) 16画素 (c) 8画素とした場合の比較



図7 6*6の窓による画面の2値化の例

内の平均値+標準偏差*2.5とした。窓内の平均値が画面の平均値-標準偏差より小さいとき窓内の平均値を閾値とした。窓内の平均値が画面の平均値-画面の標準偏差/2より大きいときは窓内の平均値-標準偏差を閾値とした。それ以外の場合おもに樹状突起の先端、背景の場合が多いが閾値を窓内の平均値-標準偏差/2とした。

3) 画面内において6*6の窓を走査させて、領域毎に人が対話型で2値化の閾値を与える。各閾値と窓内の平均値、標準偏差の組合せで最も多いものを記述しておく。次に別の画面に対して計算機で領域分割しながら、人が処理したときの窓内の平均値と標準偏差が最も近い場合の閾値を用いて2値化を行った。

4. 解析結果

図4は、同一の顕微鏡写真に対して(a)平均値、(b)平均値-標準偏差/2、(c)平均値-標準偏差、(d)最低値+5、(e)最低値+10、(f)最低値+15を閾値として画面全体を2値化した結果である。この結果から(a)、(b)、(f)は閾値が大きすぎるため、樹状突起は長く抽出されているが背景の細胞

以外の物体が多く抽出され、細胞像との分離が不可能となっている。逆に(d)は閾値が小さすぎるため、細胞体が小さくなり、樹状突起も切断してしまっている。この例では、平均値-標準偏差と最低値+10において良い結果が得られている。他の結果も総合すると最低値+10を閾値とする方法が良好であった。

しかし、最低値+10を閾値とする方法は細胞像と背景のコントラストが高い画像においては閾値が低くなり、樹状突起が切断してしまう場合が多い。図5は(a)が最低値+(平均値-最低値)/2 (b)が最低値+10を閾値として2値化した例である(b)では抽出できなかった樹状突起が(a)では抽出できていることがわかる。18個の細胞像を対象として11個の細胞は(a)の結果の方が良好であり、それ以外は同程度であった。(a)が劣る例はみられなかった。

図6は、5つの細胞像を対象として図2の閾値の決定基準を用いた場合で、(a)は閾値を窓内の最低値+10、(b)は閾値を窓内の最低値+8とし窓を16画素移動させた場合、(c)は閾値を最低値+10とし窓を8画素移動させた場合である。(a)の場合閾値が小さいためか樹状突起の抽出が行われていないことがわかる。(b)(c)はかなり正確に抽

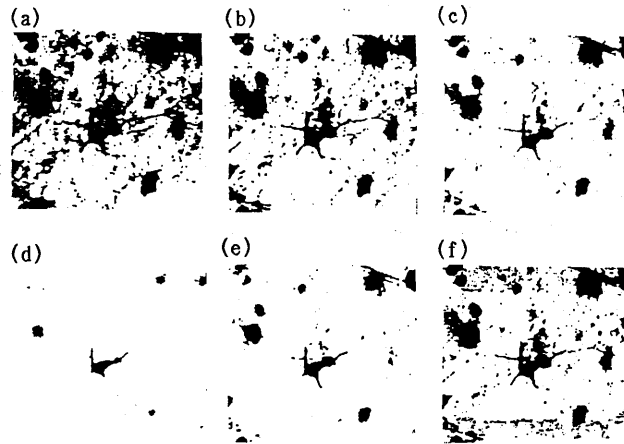


図4 画面全体を1つの閾値で2値化した例

(a)平均値 (b)平均値-標準偏差/2 (c)平均値-標準偏差 (d)最低値+5
(e)最低値+10 (f)最低値+15

出できているが樹状突起が切断したり、逆に樹状突起の周りのアーチファクトまで抽出している例もある。図7は、図6と同様の細胞を対象として図3の閾値の決定基準により2値化を行った例である。閾値の決定基準を窓内の統計的性質によりかなり詳細に変化させているため図6と比較し樹状突起がかなり長くしかも周りのアーチファクトを含まずに正確に抽出できたことが分かる。図示した以外の細胞像に関してもこの方法では正確に抽出できた。

図8(a)の細胞画像をヒトが画面を分割しながら対話型で閾値を決定し、かなり正確に細胞像を抽出した結果が(b)である。各閾値に対して窓内の平均値と標準偏差を記述した。これに対し(c)の画面は(a)と濃淡値の統計的性質が類似していたため計算機で窓を自動的に分割しながら窓内の平均値と標準偏差を計算し(a)の2値化の際記述した平均値と標準偏差に最も近いときの閾値を用いて2値化を行った結果である。この結果からヒトがサンプル画面を2値化した結果を用いて他の画面を2値化できる可能性も考えられる。

5. むすび

本稿では、画質の悪い光学顕微鏡写真からの細胞像の自動抽出法の検討結果を述べた。画面を1つの閾値で2値化する際の閾値の決定基準として従来用いられていたヒストグラムを利用するのではなく、計算の容易な画面の平均値、標準偏差、最低値を用い、最低値 + (平均値 - 最低値) / 2 により細胞像抽出に適した2値化の結果が得られた。

次に、濃淡値の異なる細胞体も樹状突起もいずれも正確に抽出するため、計算機で画面を小領域に自動分割し領域の平均値、標準偏差値、最低値、画面全体の平均値、標準偏差値を用い、閾値の決定基準を細かく設定することによりかなり正確に細胞像を抽出することができた。

また、ヒトが処理したときの閾値と画面の平均値、標準偏差等の統計的性質を記述した知識ベースを作成し、利用できる可能性も示唆できた。

これらを利用して細胞像の自動抽出を行うことにより細胞画像データベースの設計が容易になり、生物学の神経形態学の分野の研究に幅広く応用することが可能と考えられる。また、筆者らは網膜細胞認識システムの設計を行ってきたが、これをエキスパートシステムとして改良することを試みている。その一部として形態解析手法に関するコンサルテーションシステムの設計⁽¹⁵⁾を行ったが、さらに画像処理部分に今回のヒトが処理した結果を利用するための知識ベースの作成方法と知識ベースの利用を追加することができる。

最後に、本研究は平成元年度文部省科学研究補助金奨励研究(A)(01780060)の補助、及び東海学術奨励金の援助を受けて行ったものの一部であることを付記する。

参考文献

- (1) E.M. Glaser and H. Van der Loss : "Asemi-automatic computer microscope for the analysis of neuronal morphology", IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-12, pp. 22-31 (1965)
- (2) 前田 純, 塚原仲晃 : "神経細胞の画像処理による計測", 信学技報, vol. MBE79-61, pp. 47-56

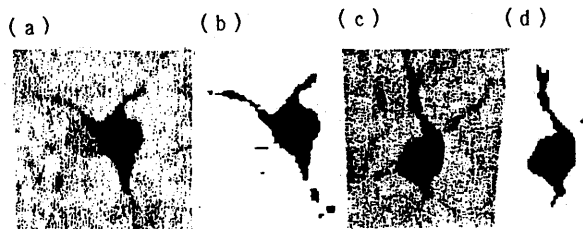


図8 細胞像の自動抽出にヒトが画面を分割して処理した結果を利用した例
(a)原画像 (b)ヒトが処理した結果 (c)原画像 (d)計算機による処理結果

(1980)

(3)横山清子, 石井直宏, 鈴村宣夫, 中 研一: "計算機による神経細胞の形態の解析", 信学論(D), vol. J68-D, No. 1, pp. 41-48, (1985)

(4)横山清子, 笹川勝久, 石井直宏, 高田和之: "網膜細胞画像認識システム", 信学論(D), vol. J71-D, No. 11, pp. 2396-2403, (1988)

(5)G. Battaglia and A. Rustioni: "Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey", Journal of comparative neurology, vol. 277, No. 2, pp. 302-312 (1988)

(6)A. Aschoff and J. Ostwald: "Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs", Journal of comparative neurology, vol. 264, No. 1, pp. 56-72 (1987)

(7)C. Evinger, W. M. Graf and R. Baker: "Extra- and Intracellular HRP Analysis of the Organization of extraocular motoneurons and internuclear neurons in the guinea pig and rabbit", Journal of comparative neurology, vol. 262, No. 3, pp. 429-445 (1987)

(8)B. Ulfhake, S. Cullheim and P. Franson: "Postnatal development of cat hind limb motoneurons I; Changes in length, branching structure and spatial distribution of dendrites of cat triceps surae motoneurons", Journal of Comparative neurology, vol. 278, No. 1, pp. 69-87 (1988)

(9)T. Bork, E. Schabtach and P. Grant: "Factors guiding optic fibers in developing xenopus retina", Journal of comparative neurology, vol. 264, No. 2, pp. 147-158 (1987)

(10)A. E. Mjaatvedt and M. T. T. Wong-riley: "Relationship between synaptogenesis and cytochrome oxidase activity in purkinje cells of the developing rat cerebellum", Journal of Comparative neurology, vol. 277, No. 2, pp. 155-182, (1988)

(11)横山清子, 石井直宏, 鈴村宣夫, 中 研一: "神経細胞の2値画像の分類", 信学論(D), vol. J66-D, No. 5, pp. 601-608, (1983)

(12)P. F. Hitchcock and S. S. Easter: "Retinal ganglion cells in goldfish; A quantitative classification into four morphological types and a quantitative study of the development of one of them", J. Neurosci., vol. 6, No. 4, pp. 1037-1050 (1986)

(13)C. W. Oyster, E. S. Takahashi and D. C. Hurst: "Analysis of neuronal soma size distributions", J. Neurosci. Meth., vol. 6, pp. 311-326, (1982)

(14)手塚慶一, 北橋忠宏, 小川秀夫: "デジタル画像処理工学" 日刊工業新聞社, (1985)

(15)田村 広, 横山清子, 高田和之: "網膜細胞形態解析用コンサルテーションシステム", 平成元年度電気関係学会東海支部連合大会, (1989)