

移動・変化する細胞核の追尾と細胞核内スポットの計測を自動で行う 画像処理システムの開発

○ 廣江 翼* 河野 清尊* 栗政 明弘**

* 米子工業高等専門学校 ** 鳥取大学大学院医学系研究科

Development of an Image Processing System for Tracking and Measurement of cell nucleus

○ Tsubasa Hiroe*, Kiyotaka Kohno* and Akihiro Kurimasa**

*National Institute of Technology, Yonago College **Graduate School of Medical Science, Tottori University

Abstract: In this paper, we present an image processing system for automatically tracking of cell nucleus and measuring of the spots in the cell nucleus.

1. 緒言

画像処理による移動・変化する物体の認識の一つの応用として、生物細胞の周期および DNA 損傷の解析に取り組んでいる。これは鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医科学専攻 遺伝子再生医療学講座の栗政明弘准教授から共同開発を提案されたものである。

本研究では、細胞の観察により得られた多量の画像情報から、細胞核の形態、DNA 損傷および細胞周期を同定する情報の抽出とその解析を行う画像処理システム（以下「本システム」という）を開発するとともに、輝度が及ぼす影響について考察を行った。

2. 本システムの概要

本システムは、放射線を照射あるいは抗がん剤を投与した細胞に、2種類の蛍光タンパク質（DNA 損傷検出用と DNA 複製検出用）を付加し、このときの細胞を培養顕微鏡で15分おきに150枚撮影した2種類の画像から、

- ① 移動し形態が変化する細胞核を追尾・抽出し、
- ② 抽出した細胞核周辺のノイズを除去し、
- ③ 細胞核内のスポット数（蛍光タンパク質が光る点の数）を計測する

という過程を自動化しようというものである。

本システムの開発には、MacBookPro(MacOS10.9.1)とImageJ 1.47vを用いた。ImageJ¹⁾はアメリカ国立衛生研究所(NIH)のWayne Rasbaund氏によって開発されたオープンソースの画像処理ソフトウェアである。マルチプラットフォームであり、Java1.1以降のVM上で動作する。

2.1 バイオセンサーによる撮影画像

細胞に生じるDNA損傷、細胞周期の移行を観察し評価するために、人工タンパク質（バイオセンサー）を細胞に付加し、波長を変えたレーザー光を照射して15分おきに約37時間撮影する。

(1) GFP-53BP1 融合タンパク質 (Fig.1(a))

これはDNA損傷検出用のタンパク質であり、緑色蛍光タンパク質GFPと53BP1タンパク質（鳥取大学で遺伝子配列に改変を加えた）を融合させた人工タンパク質である。53BP1のDNA2本鎖切断損傷に特異的に集積する性質と組み合わせることで、損傷箇所を緑色のスポットとして検出することができる。

(2) PCNA-DsRed 赤色蛍光タンパク質 (Fig.2(b))

これはDNA複製検出用のタンパク質であり、DNAの複製が起きている箇所に特異的に集積するタンパク質である。細胞周期のうち、DNAの複製が活発に行われるS期において赤いスポットを多数検出することができ、細胞周期の識別に利用することができる。



(a)GFP-53BP1 (b)PCNA-DsRed
Fig.1 Images of cell nucleus

2.2 本システムの機能

本システムでは以下の3つの過程を自動化する。

(1) 細胞核の追尾

GFP-53BP1画像において、細胞核の輪郭抽出と中心点の測定を繰り返すことで細胞核を追尾する。

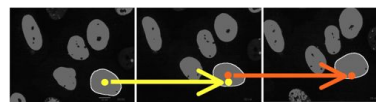


Fig.2 Tracking of a moving cell nucleus

(2) 細胞核の切り取り

GFP-53BP1画像において、抽出した細胞核の輪郭を囲う長方形より10px(ピクセル)上下左右に大きい長方形の範囲で細胞核を切り取る。同時にPCNA-DsRed画像においても同様に細胞核を切り取る。

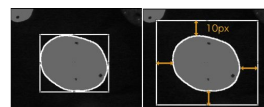


Fig.3 Cutting of the cell nucleus

(3) 細胞核のスポット数の計測

細胞核内の局所的な濃度のピーク値を測定することで、DNA損傷箇所およびDNA複製箇所を両画像から検出し、その数を計測する。



(a)GFP-53BP1 (b)PCNA-DsRed

Fig.4 Measuring of the spots in the cell nucleus

3. 解析・測定手順

ImageJのマクロを用い自動化を行った。細胞核の輪郭抽出にはImageJのWand tool機能を、スポット数の計測にはFind maxima機能を用いた。

(1) 画像の二値化

与えられた画像のうちGFP-53BP1画像から細胞核の輪郭を抽出し易くなるように閾値を手動で調整し、ImageJのコマンドを用いて二値化する。(Fig.5)



Fig.5 Binarization(GFP-53BP1)

(2) 追尾する細胞核の選択

GFP-53BP1画像スタックのうち、一番最初の画像(スライス)において追尾したい細胞核内にマウスポインタを移動して、被計測細胞核を選択し、Wand tool機能を用いて輪郭を抽出する。(Fig.6)



(a)GFP-53BP1 (b)PCNA-DsRed

Fig.6 Extraction of contour

(3) 細胞核の追尾と切り取り

① 選択した細胞核の上下左右から10px大きい長方形を範囲とした画像を切り取る。

② 切り取った画像において、細胞核の周囲のノイズを除去する。(Fig.3)

③ スライスを一つ進め、前スライスでの細胞核の中心座標(x, y座標の平均値)をWand tool機能に与え、細胞核の輪郭を抽出する。この時、前スライスからの細胞核の移動距離は、細胞核径の1/2以下であると仮定する。(Fig.2)

①から③の手順を全てのスライスに対して行う。切り取った細胞核の画像はスタックに保存される。

(4) 細胞核のスポット数の計測

切り取った細胞核からFind maxima機能を使ってスポット数を計測する。ImageJのFind maxima機能ではNoise tolerance (NT) 値を与えなければならないが、現在は、80, 100, 120という固定値を用いた。(Fig.7)

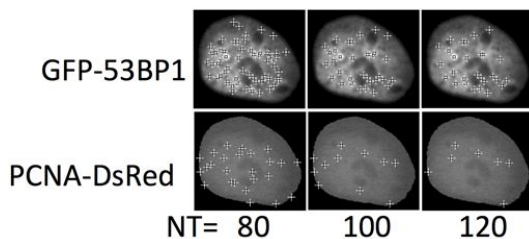


Fig.7 Number of spots by changing NT

本研究ではこの(1)から(4)の手順のうち、(3)および(4)の自動化を行った。

【手順(3)における例外処理】

- (1) ①において、切り出し範囲が元画像の外側にはみ出た場合
→ 細胞核が画像からはみ出したと判定(処理を中止)
- (2) ②において、細胞の輪郭を抽出した後にその面積が
 - ・ 小さい場合(1000px未満)
→ 核小体と判定(中心座標を移動して再抽出)
 - ・ 前スライスより50%以上増加した場合
→ 他細胞核との重複と判定(処理を中止)
 - ・ 前スライスの75%未満になった場合
→ 分裂または消滅と判定(処理を中止)

4. 測定結果

ある細胞核におけるスポット数の測定結果をFig.8およびFig.9に示す。この結果より、NT値によってスポット数に大きな差が生じることが分かった。また、特にFig.8より、輝度の最頻値(Mode値)のバラツキが、スポット数のバラツキに大きく影響していることが分かった。

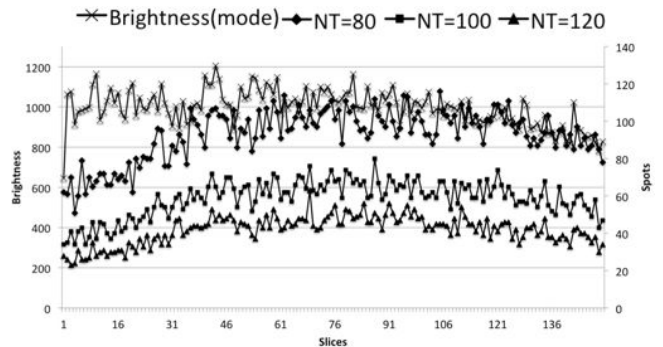


Fig.8 Results of measurement (GFP-53BP1)

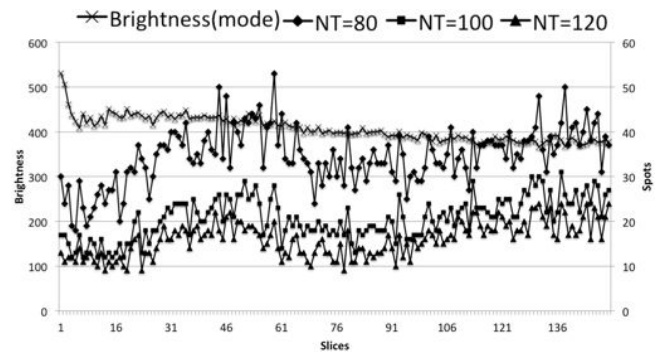


Fig.9 Results of measurement (PCNA-DsRed)

5. 結言

本研究では、移動変化する細胞核の追尾と細胞核内スポットの計測を自動化する画像処理システムの開発を行った。

今後は、輝度のMode値に応じた適正なNT値の決定方法の検討および二値化と細胞核の選択(手順(1)と(2))の自動化を行う。

参考文献

- 1) ImageJ <http://imagej.nih.gov/ij/>