

第1章 序 説

1. 細胞核DNA量計測の意義とカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の背景

細胞は、分裂休止期（G1期）、DNA合成期（S期）、分裂前休止期（G2期）および分裂期（M期）という一定の細胞周期を経て分裂・増殖する。この間、細胞の遺伝情報を担う核DNAは、S期で合成され、その核DNAの総量は、G2+M期では、G1期（2C）の2倍（4C）となり、細胞分裂により2分の1となって、もとの2Cとなる(1)。この細胞の増殖動態は、細胞周期各期に分布する細胞集団を用いて、細胞個々のDNA量を定量的に計測すること、すなわちDNAヒストグラムを製作することによって解析することができる。この細胞の核DNA量の計測方法として生まれたのが、顕微分光測光法であり、顕微蛍光測光法、フローサイトメトリーである。それぞれ長短はあるが、現在では、顕微蛍光測光法とフローサイトメトリーが一般に用いられている(2-4)。

顕微分光測光法は、細胞の形態観察に加えて、細胞の生理・生化学的特性を定量的に捕らえる試みとして、1942年 Caspersson (5)らによって考案された。ここに初めて人類は、個々の細胞の核酸あるいは蛋白質の量を測定する方法を手に入れたのである。その後、対象物質に特異的に結合させた蛍光色素の蛍光量を測る顕微蛍光測光法が、さらにフロー方式と呼ばれる新たな細胞の自動検出法に基づきフローサイトメトリーが開発され、それぞれ改良され発展してきた。顕微分光測光法はその測定精度が劣ることから現在ではあまり用いられなくなっているが、その細胞形態を観察できるという利点は捨て難い。

画像処理技術の医学領域への応用は、すでに1952年に R.C.Mellors ら(6)が自動細胞診装置の開発を試みているが、当時は技術も未熟であったため、鮮明な顕微鏡画像を電子的に処理できずに失敗に終わった。その後も、画像処理を細胞診の自動化へ応用するためのさまざまな研究が行われてきた。それは、細胞（核）の大きさや染色状態を定量化する試みから始まり(7-11)、やがて物質（とくにDNA）の定量が試みられるようになった(12-14)。

最近のエレクトロニクス分野の急速な発達により、撮像・画像解析装置の性能が飛躍的に向上し、それらを利用することでようやく本格的に画像解析による細胞核DNA

A量の定量が可能になってきた。撮像装置としては、これまでの光電管を基礎にしたTVカメラから、固体素子を利用したCCDカメラが一般に利用できるようになり、感度・安定性が大きく向上した。また、分解能（解像度）も高くなり、いわゆるハイビジョン対応になりつつある。一方、画像解析装置もコンピューターの進歩、普及にともなって、容易に利用できるようになってきた。これらのエレクトロニクスの発達を背景に細胞・組織レベルの物質定量の第四の方法として登場したのが画像解析法である。DNA量の定量と同時に核の形態計測や解析が可能なのがこれまでのフローサイトメトリー、顕微分光測光法にはない本法の特徴である。

近年、癌集団検診の普及により細胞診標本の数は増加の一途を辿っており、大量の検体を客観的に正確に診断する必要性から、これまでの形態学的な診断法に加えて、定量的な診断技術の導入が待たれている。癌細胞はしばしば異常な核DNA含量を示すことが知られており、最近ではDNAヒストグラム解析を癌の診断や治療効果判定などに利用する試みが数多くなされている(15-19)。これまで、癌の最終診断は、一般に経験に基づく病理形態学的なパターン認識によって行われており、その形態情報と核DNA量の解析を結びつけることのできる方法を開発することが本研究の出発点である。

2. 本研究の概要

細胞核DNA量をカラー画像解析装置を用いて顕微測光する方法を考案した。本法は、基本的には従来の顕微分光測光法と同様の原理（Lambert-Beerの法則）に基づくものであるが、顕微鏡・カメラを介して入力された画像を用いて測定を行うため、顕微分光測光法とは大きく異なる点がある。また、核DNAの染色物質に特異的な干渉フィルター（band-pass filter）を用いる代わりにカラーカメラの映像を構成する三原色成分の画像を利用することも本法のユニークな点である。

本研究では、まず、今回考案した画像解析法の理論的検討を行った。その要点は、分光測光法の最大の問題である分布誤差と非特異的光喪失への対処方法にある。すなわち、1) 顕微分光測光法では、分布誤差を減ずるために測定領域を小さな測光スポットで走査する方法が用いられている。画像解析法では、顕微鏡を介して撮影された画像を用いて測定を行うが、画像は画素(pixel)と呼ばれる小さな区画の集合であり、測定対象は入力された時点で分割（デジタル化）されるので、走査の必要がない。顕微分光測光法が「点」での測定に対して、画像解析法では「面」での測定となるため分布誤差の減少、測定精度の向上が期待でき、また、測定時間の短縮が図れる。2) 非特異的光喪失に関しては、分光測光法では通常、干渉フィルターを用いた二波長計測をすることで対処している。本画像解析法においては撮像装置がカラー対応であることに着目し、より簡便に非特異的光喪失を除去する方法として、カラー画像を構成する二成分を干渉フィルターの代わりに利用する方法を考案し、それが理論的に可能であることを示した。（第2章）

次に、この細胞核DNAのカラー画像解析法の理論に基づいて実際の測定を行うために必要な装置の構成及び、測定解析のアルゴリズム・手順を具体的に検討した。その際、重要な点はカラーカメラとして自己走査型荷電結合素子（CCD; Charge-Coupled Device）カメラを用い、測定解析アルゴリズムを一般に普及している汎用画像処理装置で稼働できるものとした点である。引き続いて、実際に非特異的光喪失を除去するための係数 γ を決定し、各種細胞の核DNA量の測定を行い、本画像解析法の定量性・精度を検討した。具体的には、1) 本測定法の系統誤差を評価するために、同じ核DNA量を持ちながら、核の形態・面積が異なるリンパ球と好中球のDNA量を測定し、両者の値を比較した。2) 本法の定量性を検討するために、リンパ球の核

DNA量とその半分のDNA量を持つ精子のDNA量を測定した。3) 広波長フィルター(カラーカメラの色成分)を利用したことの妥当性を調べるために、干渉フィルター(band-pass filter)を用いて測定した核DNA量と、本法の測定結果とを比較した。(第3章)

本法の基礎的な応用としては、種々の培養癌細胞のDNAヒストグラム解析を行い、フローサイトメトリーによって得られたデータと比較した。具体的には、薬剤により細胞周期を同調させた時、及び、培養血清濃度を变化させた時のDNAヒストグラムの変化を解析した。(第4章)

最後に、本法の臨床応用として、肺癌の細胞診標本のDNAヒストグラムの解析を行うとともに、画像解析法の特徴を活かして核の形態量の同時計測を試み、核の病理形態学的異型度と比較検討した。(第5章)