

第2章 細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の理論

第1節 序 論

細胞核DNA量の測定法としては、序説でも述べたように、従来、顕微分光測光法、顕微蛍光測光法、フローサイトメトリーが用いられている。

顕微分光測光法は分光光度計の原理、すなわち吸光度（透過率）を測ることで細胞内の物質量を測定する方法である。本法は歴史も長く、様々の改良が加えられているが、精度、スピードの点で問題がある。しかし、顕微分光測光法の直接、細胞形態を観察できるという特徴は、特筆すべきことである。

顕微蛍光測光法は、細胞または核内の対象物質に蛍光色素を特異的に結合させ、特定の励起光によって標本からある一定範囲の方向に放射される蛍光の量を光電管で測定する方法である。顕微蛍光測光法の利点は原理的には、1) 分布誤差を考慮する必要がなく、顕微鏡の暗視野で蛍光を発する物質を測定するのでその物質の分布状態と関係なく出てくる光量は変わらないので、走査測光は不要であること、2) 暗視野における蛍光量はその発光体の像が結ばれても結ばれなくても変わらないので顕微鏡の解像力の限界を越える小粒子も測定対象となりうること、3) 測光の感度は蛍光を受ける光電管の感度によって決まるが、これを容易に高め得るので測光感度は極めて高く、顕微吸光測光の感度の数百ないし数千倍の感度を示すこと、などである。これらの利点のために現在、フローサイトメトリーとともに一般的に用いられている方法である。

フローサイトメトリーは、粒子（細胞、核）中の対象物質に蛍光色素を結合させ、その粒子を細い水流中に高速で流しながら、光を照射して、その粒子から放射される蛍光と散乱光とを測定する方法である。フローサイトメトリーの最大の利点は大量の試料を正確かつ高速に処理できることであるが、その反面、細胞形態を直接見ることができないという欠点がある。また、少量の細胞しか得られない場合にはその威力を発揮できない。

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、それらを利用して細胞の核DNA量を計測することが可能になってき

た(12-14)．画像解析法と呼ばれるこの方法は、顕微分光測光法の流れをくむものであるが、顕微鏡、カメラを介して取り込まれた画像（デジタル画像）を用いて測定を行う点が従来の方法と異なる．画像処理とは、簡単に言うと取り込まれた画像上の濃淡情報の抽出、形態量の計測、複数の画像間での情報のやりとり（いわゆる画像間演算）等の画像上の情報の加工を行うものである．この画像処理の技術を利用した画像解析法による細胞核DNA量の顕微測光法には、1) 細胞形態を見ながら測定できる、2) 顕微測光法の「点」での測定に対し、画像すなわち「面」の単位で測定するために高速化が図れる、3) 形態情報の処理も同時に可能である、といった特徴がある．

今回考案した細胞核DNA量をカラー画像解析装置を用いて顕微測光を行なう方法は基本的には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、カラー画像を用いるという点でいくつかの特徴がある．本章では、その特徴を述べるとともに今回考案したカラー画像解析法の理論的検討を行う．

第2節 細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の理論

細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の理論を測定原理及び方法が確立されている顕微分光測光法と対比しながら述べる．

2-1．測定の原理

今回考案したシステムの細胞核DNA量の測定法は、組織化学における顕微分光測光法と同様に、溶液中の溶質の濃度を測る分光光度計の原理である Lambert-Beer の法則(3,4,20-24)を基礎としている．

この法則は1) 入射光が単一波長で、2) 対象が透明であり、かつ、その中に吸光物質が均一に分布しているならば、入射光の強さに対する透過光の強さの比（透過率）は一定であり、その逆数の対数（すなわち吸光度）が、対象の厚さと吸光物質の濃度

に比例するというものである。

一般に透過率を T [透過光量 / 入射光量]，吸光度を A ，対象の厚さを l ，吸光物質の濃度を d ，定数を（吸光係数）を k とすると

$$A = -\log T = k \cdot l \cdot d \quad \dots (1)$$

なる関係が成り立つ。（吸光係数は吸光物質の性質と入射光の波長で決まる常数である。）

ここで測定対象として、理想的な状態の細胞の核を考えてみると、細胞核の厚さが一定と見なせ、また、核内に吸光物質が均一に分布しているならば、測定領域の平均吸光度を A ，核の面積を S として、その測定領域全体の吸光物質の量 M は、

$$M = S \cdot A / k \quad \dots (2)$$

で得られることになる。すなわち吸光度と面積から吸光物質の相対量が求められるのである(3,4,20,24,25)。

2-2. 細胞の核 DNA 量を計測する上での問題点

実際に細胞の核を測定対象とするときは、ほとんど常に 1) 吸光物質の分布が不均一で、2) 試料の厚さも一定でなく、3) 吸光物質以外の原形質構造が混在している、等の問題を内在しているため、光は不規則に散乱（反射，屈折，回折）される。したがって、細胞の核内の吸光物質の量を計測するのに Lambert-Beer の法則を単純に適用することはできない(3,4)。

以下、これらの条件を克服するための方法を考える。

2-3. 分布誤差の対策（走査法から画素点分割法へ）

試料内の吸光物質の分布が不均一なため、また試料の厚さが一定でないために生じる誤差を分布誤差(distributional error)という(Fig.2-1)(3,20,26,27)。これを最少限にするために顕微分光測光法では走査法(scanning method)が用いられる(20-22, 26-30)。これは、測定領域をできるだけ小さな区画に分け、各小区画の吸光度 A_i が

ら区画ごとの物質質量 m_i を求め、それを加算することにより測定領域全体の物質質量 M を求めるというものである。

$$M = \sum m_i = (\sum \alpha A_i) / k \quad \dots (3)$$

実際の計測に際しては、測光するスポットがこの小区画にあたる。この小区画のサイズを小さくするほど分布誤差を減らすことができ、測定の精度が上がるわけである。しかしながら、光学的・物理的・機械的な制約があり、そのサイズは光学的な顕微鏡の解像力の限界に近い大きさが現実的には望ましいと考えられている(3)。尚、測定スポットをある程度小さくしても、測定対象と対象のない素通しの部分にまたがる部分ではやはり分布誤差は生じ、これを residual distributional error と呼ぶ(31)。この誤差は、スポットサイズが対象に比べて大きければ大きいほど、また、対象の吸光度が大きければ大きいほど比例的に大きくなり、総吸光度の見積もりの低下を来す(3,31,32)。

一方、画像解析法では、測定対象の光学顕微鏡像をカラービデオカメラで撮影し、デジタル画像処理装置に入力する(画素点分割法)。このとき画像は 500×500 程度の二次元配列(デジタル画像)に変換される。配列の要素は画素(pixel)と呼ばれ、デジタル画像処理ではこの画素を最小構成要素として各種処理を行う。これは上述した小区画、顕微分光測光法における走査スポットに相当するから、抽出した細胞核内の各画素の計測値を総和することで走査法と同等の処理ができる。(Fig.2-2)

顕微分光測光の走査法と比べると、画素点分割法は画像単位に処理が行えることから走査する必要がなく、さらに、像に含まれる複数の測定対象を同時に計測することができるので計測の高速化を図ることができる。また、測定対象の像を見ながら計測できるので、測定領域(即ち、細胞核)の選択・限定が容易であるという利点もある。

2-4. 非特異的光喪失の対策(二波長測光から二カラー成分測光へ)

標本中の細胞の諸構造やそれらに含まれる物質などは相互に相違する屈折率を有するので標本中で光の屈折、反射、回折、偏光などが起こる結果、光散乱を生じて非特異的光喪失(non-specific light loss)が生じる(3,20-23,25,26,28)。

顕微分光測光において、この誤差の影響を除去するために案出されたのが二波長走

査法(two-wavelength scanning method)である(20-22,26-28,30,33,34)。この方法は、対象物質の吸収ピーク付近の波長(特異的吸収波長)における吸光度から、その物質がほとんど吸収しない波長(非特異的吸収波長)における吸光度を差し引いた値を真の吸光度とするものである。

特異吸収波長における吸光度を A_1 、非特異的吸収波長における吸光度を A_2 とすれば、 γ を常数として、真の吸光度(の相対値) A は

$$A = A_1 - \gamma A_2 \quad \dots (4)$$

で与えられる。

画像解析法においても2つの干渉フィルターを用いて同等の処理が可能であり、同等の精度でかつ高速化が可能であるが、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を考えた。

2-4-1. カラーカメラのR・G・B成分の分光感度特性と フォイルゲン物質の吸光曲線との関係

細胞の核DNA量を分光測光するとき用いられるDNAの特異的染色法であるフォイルゲン染色(3,21,23,25,27,34-36)に注目してみる。ここでは、フォイルゲン染色により特異的に染色された物質(≒DNA)をフォイルゲン物質と呼ぶことにする。

カラー撮像装置の画像はR(Red)・G(Green)・B(Blue)の3成分から構成されている。Fig.2-3は、そのR・G・B成分の分光感度特性とフォイルゲン物質の波長吸光曲線の関係を示したものである。

まず、フォイルゲン物質の吸光特性に注目してみると、吸光ピークは550nm付近であり、450nmでは吸光がほとんどない。顕微分光測光の二波長走査法では、一般にこの2つの波長について計測している。

次にカラーカメラの分光感度特性を見てみると、G成分の感度ピークの波長は550nm付近、B成分の感度ピークの波長は450nm付近である。また、G成分の分光感度特性曲線とフォイルゲン物質の吸光特性曲線がほぼ一致していることが分かる。

そこで、フォイルゲン物質を測る場合には、broad-bandのカラーカメラの色分離

フィルターを用いることによって、本来、単色光が要求されている Lambert-Beer の法則を適用できるのではないか、また、B成分の感度ピークの波長が 450nm 付近で、G成分との重なりが少ないので、G成分とB成分の出力信号を用いて二波長走査法と同様に非特異的光喪失を補正することが可能と考えた。つまり、カラーカメラのR・G・Bビデオ出力を用いることによってフォイルゲン物質の吸光度の定量的な計測が可能と考えたのである。

2-4-2. カラーカメラのG・B成分による非特異的光喪失の補正

理論的に言って、いかなる波長 λ の吸光度も目的とする物質の特異吸光度 F_{λ} と非特異的吸光度(=非特異的光喪失) N_{λ} の和から成っている(7)。カラーカメラのG成分、B成分で測定される吸光度も同様である。G成分、B成分で測定される吸光度、それを構成しているフォイルゲン物質の吸光度、非特異的光喪失の関係の簡略化して示したのが Fig.24 である。

G成分で測定される吸光度を A_g 、 A_g 中のフォイルゲン物質の真の吸光度を F_g 、 A_g 中の非特異的光喪失を N_g 、B成分で測定される吸光度を A_b 、 A_b 中のフォイルゲン物質の真の吸光度を F_b 、 A_b 中の非特異的光喪失を N_b とすると、

$$F_g = A_g - N_g \quad \dots (5)$$

$$F_b = A_b - N_b \quad \dots (6)$$

である。ここで、

$$\beta = F_b / F_g \quad \dots (7)$$

$$\gamma = N_g / N_b \quad \dots (8)$$

とすると、(5)～(8)式より

$$(1 - \beta\gamma) F_g = A_g - \gamma A_b \quad \dots (9)$$

となる。ゆえに、G成分におけるフォイルゲン物質の真の吸光度 F_g は

$$F_g = (A_g - \gamma A_b) / (1 - \beta\gamma) \quad \dots (10)$$

である。

したがって、 β 及び γ を求めることにより、カラーカメラの色成分出力を用いたフォイルゲン物質の定量が可能と考えられる。

フオイルゲン染色を施さない測定対象について測定したG成分，B成分の吸光度は非特異的光喪失だけを表していると考えられるから， γ は実験的に求めることができる。

β は，フオイルゲン物質のみの状態で測定を行うことによって求めるべきであるが，非特異的吸光を伴わないフオイルゲン物質の調整は極めて困難なため，シミュレーションで求めることにした。

フオイルゲン物質の吸光特性曲線をもとに，ある濃度*i*の試料の吸光度 $A_i(\lambda)$ における透過特性 $T_i(\lambda)$ を求める。

透過光をカラーカメラで受けたときの出力を G_i ， B_i とし，これを透過光レベルとするとカメラの出力は，入射光の強度が波長に対して一定なら，透過特性 $T_i(\lambda)$ とカメラの分光感度特性 $f_j(\lambda)$ ($j = R, G, B$) の積の積分に比例するから，

$$G_i = k_G \int T_i(\lambda) \cdot f_G(\lambda) d\lambda \quad \dots (11)$$

$$B_i = k_B \int T_i(\lambda) \cdot f_B(\lambda) d\lambda \quad \dots (12)$$

で表される。ここで，特に $A_i(\lambda) = 0$ のとき $i = 0$ とする。この時， G_0 ， B_0 は入射光レベルに相当するから，G成分，B成分の吸光度 A_{Gi} ， A_{Bi} は，

$$A_{Gi} = -\log(T_{Gi}) = -\log(G_i/G_0) \quad \dots (13)$$

$$A_{Bi} = -\log(T_{Bi}) = -\log(B_i/B_0) \quad \dots (14)$$

となる。

ここで少しずつ濃度の異なるフオイルゲン物質の試料があり，この試料のG，B成分の吸光度 A_{Gi} ， A_{Bi} を非特異的光喪失が起こらない理想的な条件下で測定する場合を想定してコンピュータシミュレーションを行うと， A_{Gi} ， A_{Bi} の値は Fig. 2-5 のように変化する。この図から A_{Gi} ， A_{Bi} の比はほぼ一定と見なせることがわかる。

(7)式 $\beta = F_b / F_g$ より， β はこのような理想的な条件下でのG，B成分の吸光度の比と考えられるから，このシミュレーションの結果から β を0.132とした。

2-5. その他の誤差

(1) Schwarzschild-Villiger(S-V)効果

顕微吸光測光の光学系内における光の多重反射と散乱が原因となって生じる測定誤差があり、これを Schwarzschild-Villiger(S-V)効果(25,27,32,34,37,38)という。S-V効果による誤差は本質的に補正することはできないので、できるだけS-V効果を除去するように光学系を選定する必要がある。顕微分光測光法では、この効果は標本を広く照射して測光側でピンホールを絞ると大きくなることが知られているので、これを最小限にするため標本面でピンホールを絞り、測光する部分だけを小さいピンホールで照射する方法が用いられる。画像解析法におけるS-V効果による誤差に関する報告はまだなく、今後の課題である。

(2) 濃度誤差

吸光測光で吸光度と物質濃度との間に比例関係が成立するのは吸光度が2より小さい場合だけであり、吸光度が2を越えると急速に両者の比例関係は失われる(3,32)。これを避けるためには、1) 染色条件をコントロールして最大の吸光度が2より大きくならないようにするか、2) 測定の際に測定波長を吸収ピークからずらすか、しなければならない。今回考案した画像解析法では測定波長(色成分)を変更することは困難なので、染色に細心の注意を払った。

第3節 小括

細胞の核DNA量の測定法としては、顕微分光測光法，顕微蛍光測光法，フローサイトメトリーが通常用いられるが，最近の画像処理機器，コンピュータの急速な発達により画像解析法でも核DNA量の測定法が可能となってきた。

画像解析法を生物試料に適用する場合の利点としては，形態情報の観察や計測が容易であること，しかもそれが同時的に可能なこと，また，画像に含まれる複数の測定対象を同時に計測することができるので計測の高速化を図れること，さらには測定対象の像を見ながら計測できるので，測定領域の選択・限定が容易であることが挙げられる。

しかし，細胞レベルの大きさの生物試料に含まれる物質を定量する場合には，様々な障害がある。分光測光法を適用する場合の最大の問題は分布誤差と非特異的光喪失である。これらを解決すべく以下の2点についてカラー画像解析装置を用い新たな方法を考案し，理論的な検討を行った。

顕微分光測光法では，分布誤差を減ずるために走査法が用いられるが，画像解析法では，入力された画像上で測定を行うため，測定対象がすでに画素と呼ばれる小さな区画を単位に分割（デジタル化）されているので改めて走査する必要がない。これは，先に述べた画像解析法の利点につながるものである。

非特異的光喪失に関しては，通常分光測光法では干渉フィルターを用いることで対処している。画像解析法においても干渉フィルターを用いて顕微分光測光法の二波長走査法と同等の処理が可能であるが，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を考えた。そして，色分光されたカラー画像を直接用いても，フオイルゲン色素の定量が可能であることを理論的に示した。

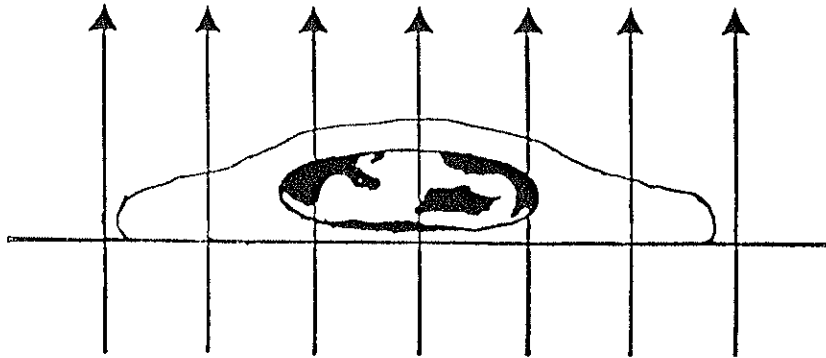
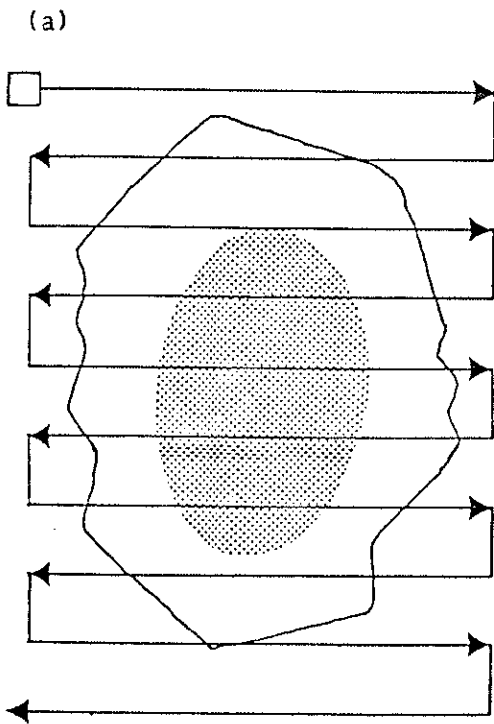


Fig. 2-1 Schema of distributional error.



MICROPHOTOSPECTROMETRY

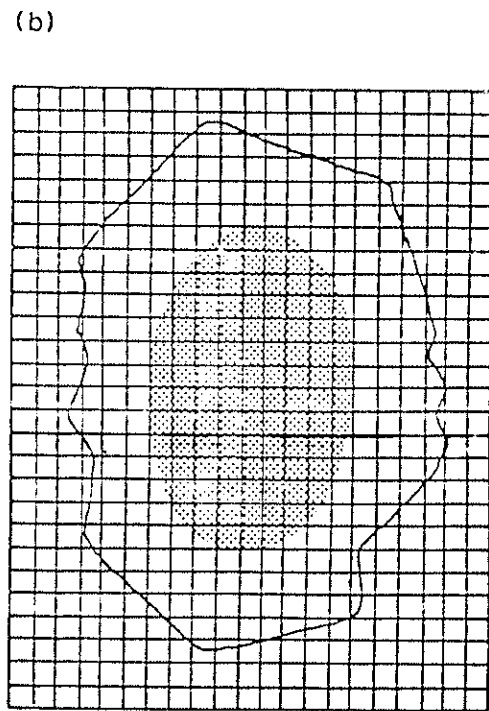


IMAGE ANALYSIS

$$M = \sum M_i = k \sum A_i$$

Fig. 2-2 Method for distributional error

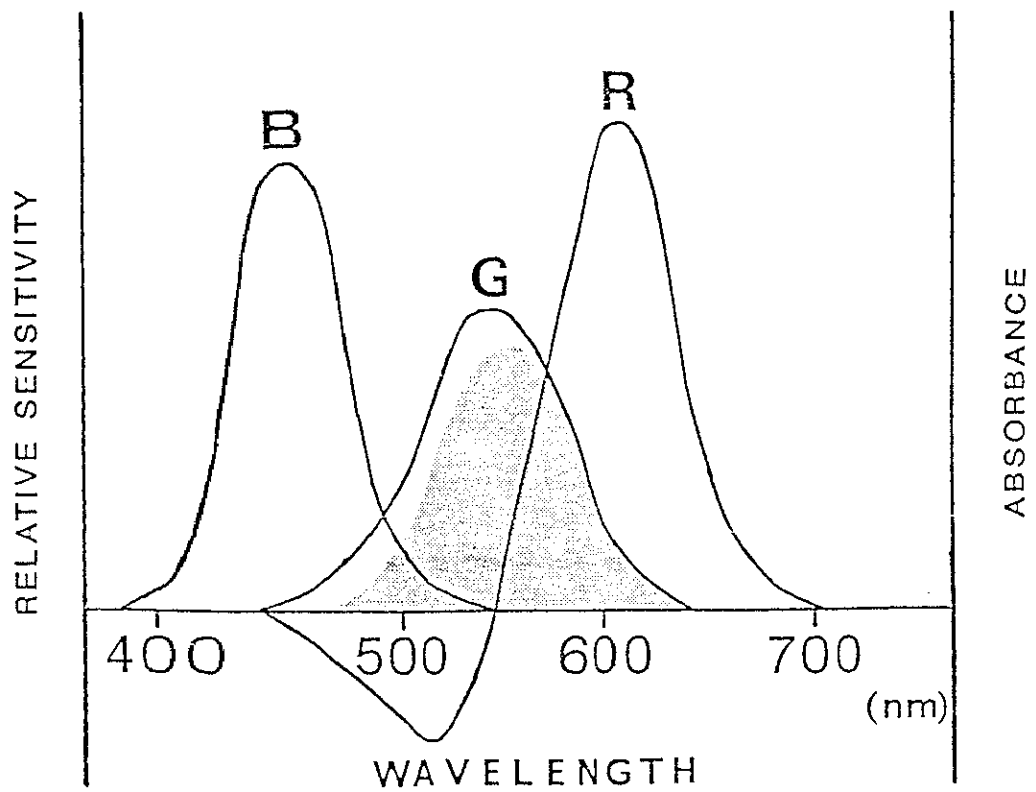
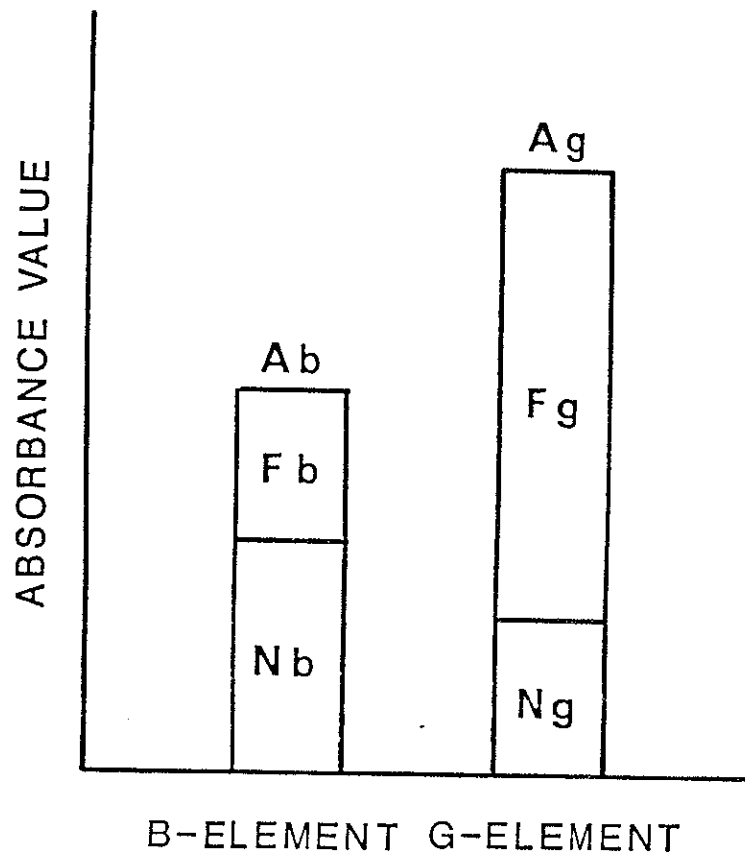


Fig. 2-3

Spectral sensitivity of R, G, B-elements of color camera and absorption curve of Feulgen-stained material (shaded area)



$$F_g = \frac{A_g - \gamma A_b}{1 - \beta \gamma} \quad \beta = \frac{F_b}{F_g} \quad \gamma = \frac{N_g}{N_b}$$

Fig. 2-4

Schema of measured absorbance values (A_g , A_b), which are composed of non-specific light loss (N_g , N_b) and absorbance values of Feulgen-stained material (F_g , F_b).

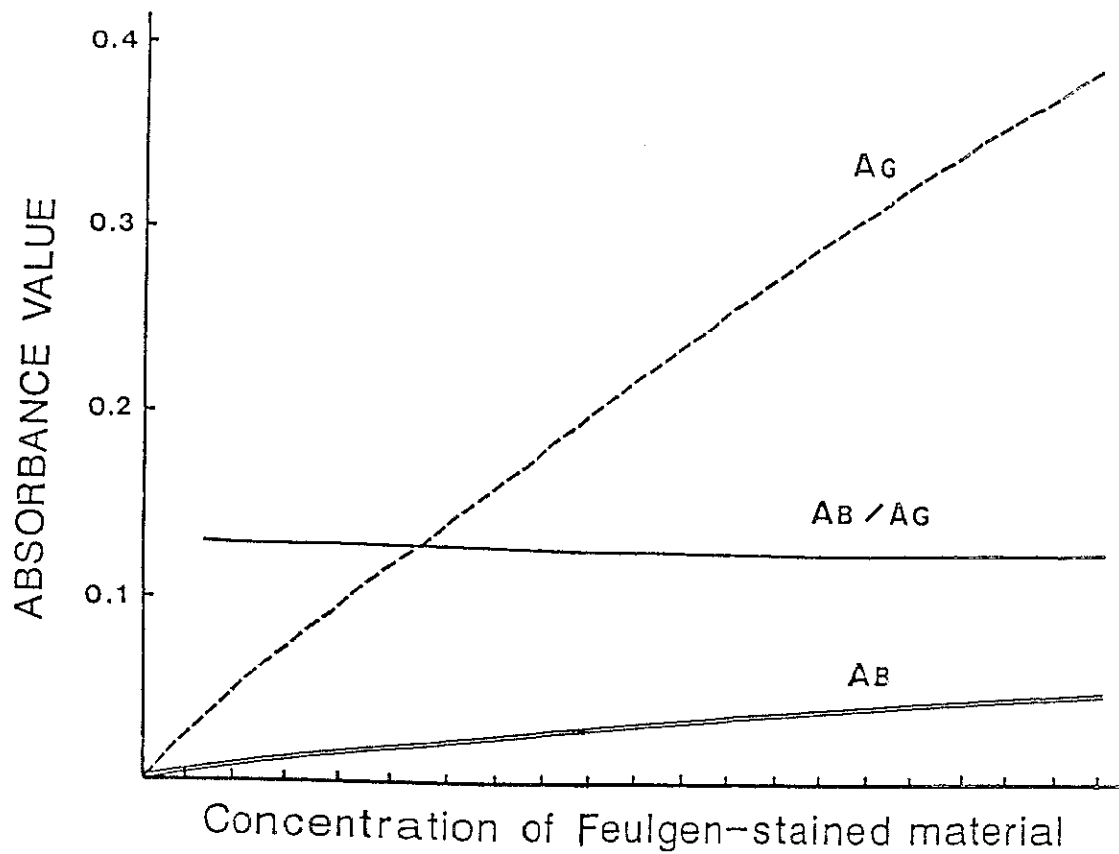


Fig. 2-5

Absorbance value of Feulgen-stained material (Ag, Ab), when no existence of non-specific light loss. (Computer simulation)