

第3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開発

第1節 目的

前章では、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展開した。

本章では、まず、その理論に基づいて実際に細胞の核DNA量を測定するための、装置の構成、測定のアプローチ・手順を検討した。次に、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、今回考案した画像解析法の定量性及び精度を検討した。

第2節 装置の構成（ハードウェア）

装置のブロックダイアグラムを Fig.3-1 に示す。

（1）光学顕微鏡

画像の入力部分には、光学的安定性の優れた顕微鏡（AHT；オリンパス）を用いた。顕微鏡光源にはハロゲンランプを使用し、安定化電源（PS-201；日本巻線工業）によって継時的な光源ムラを防いだ。対物レンズはSPlan Apo $\times 40$ （開口数0.95；オリンパス）を用いた。顕微鏡のステージには、サンプル移動装置（MS-NV；サッポロビール）が装着できる。この装置を用いることによって、 x 軸・ y 軸両方向に自動的および手動的にステージを移動させることが可能であり、また、 x 及び y 座標を任意に設定・解除することができる。

（2）カラーカメラ

撮像装置には、36万素子を備えた三板式カラー自己走査型荷電結合素子（CCD；Charge-Coupled Device）カメラ（KY-F30；ビクター）を使用した。

画像解析法における撮像には、TVカメラまたはCCDカメラが用いられる。本測光法の目的に合った特性を持つカメラを選択する必要がある。最近一般に利用できるようになってきたCCDカメラは、従来のTVカメラに比較して、1) 高感度、2) 高S/N (信号対雑音)、3) 残像が少ない、4) 焼き付けがない、5) 振動に強い、6) 長寿命、等の利点を持ち、種々の方面での応用が試みられているが、本法における入力装置としても優れている。CCDカメラでは、走査にTVカメラのように電子ビームを使わず、回路的にパルスを送ってモザイク状に独立した素子を次々にスイッチする方法をとる。TVカメラの点での走査に対し、CCDカメラでは一素子の一定の面で走査されて光情報が蓄積され転送されるため、情報量の精度が高く、測光法に適していると考えられる。

尚、カメラにはモニタが接続され、常時カメラの出力を確認できる。

(3) カラー画像処理装置

画像の処理には、汎用カラー画像解析装置 (SPICCA-II; 日本アビオニクス) を用いた。この装置には、16枚の画像メモリと3枚の二値メモリが装備されている。各メモリは、水平方向512画素、垂直方向480画素のマトリクスから構成されており、画像メモリの1画素の明暗情報は256段階 (8ビット) に分解される。(画像メモリ16枚の内訳は、カラーメモリが3プレーン×4枚、ワークメモリが1プレーン×4枚である。)

(4) パーソナルコンピュータ

カラー画像処理装置の制御およびデータ処理には、16ビットのパーソナルコンピュータ (PC9801VM4, 主メモリ512Kバイト; 日本電気) を用いた。このコンピュータには、数値演算プロセッサ、フロッピーディスク装置、20Mバイト固定ディスク装置が内蔵され、また、結果の出力用にプリンタ (PC-PR101; 日本電気) が接続されている。

この構成で光学顕微鏡のステージ上の標本の拡大像が、カラーカメラを介して入力されると、光軸を中心とする像は512×480画素に分割され、明暗情報は256段階にデジタル化される。この時、1画素の大きさは実像の $0.100\mu\text{m}^2$ に相当

する。顕微鏡の理論的な解像度 Δx は、測定波長を λ 、対物レンズの開口数を NA とすると

$$\Delta x = \lambda / (2 \cdot NA)$$

で与えられる。この装置構成での顕微鏡の光学的な最大分解能は、理論上、波長 530nm で約 280nm 、波長 400nm で約 210nm となり、1画素の面積の大きさはほぼ光学顕微鏡の最大分解能に相当する大きさになるので、顕微鏡像のデジタル化（画素への分割）は妥当な大きさと考えられる。

第3節 画像処理のアルゴリズムおよび測定手順

3-1. 画像処理のアルゴリズム（画像入力から細胞核DNA量の出力まで）

画像処理には、汎用画像処理ソフトウェア（IC5098；日本アビオニクス）、および専用ソフトウェアを使用した。

（1）画像入力（背景，対象）

光学顕微鏡で拡大された対象像，および背景像は，CCDカラーカメラで映像信号化し，デジタル画像処理装置に入力される。入力された映像信号は， 512×480 画素(pixel)，256階調にデジタル化され画像メモリに記憶される。

カラー画像メモリ（カラープレーン）は $R \cdot G \cdot B$ の3プレーンで構成されている。カラープレーンを $C_l (l=0,1,2,3)$ ，カラープレーンを構成している R, G, B プレーンをそれぞれ R_l, G_l, B_l と表す。また，画像上の画素の座標を $(m,n) [0 \leq m \leq 512, 0 \leq n \leq 480]$ で表し，座標 (m,n) 上の画素の輝度を $R_l(m,n), G_l(m,n), B_l(m,n)$ とする。

背景画像：透過率画像を作成するための参照用（reference or background image）の画像である。（この時，カメラに到達する光はスライドガラス，封入剤，カバーガラスだけを透過してきたものと考えられる。）測定対象の載ったプレパラート上の細胞のない部分を C_2 プレーンに入力する。

対象画像：測定対象（細胞核）を含む画像(object image)を C_3 プレーンに入力す

る。

(2) 透過率画像の作成

画素ごとに対象画像の明暗情報を背景画像のそれと除することにより透過率を求めることができるが、画像処理装置の機能を活かし、処理の高速化を図るために画像メモリ間演算を行う。

対象画像 (C3) と背景画像 (C2) の画像メモリ間演算 (係数つき除算) を行うことにより透過率に相当する値を画像メモリ上に記憶させる。本来、透過率は [0 ~ 1] であるが、画像メモリ間演算を用いるため透過率を [0 ~ k (0 < k ≤ 255)] の整数で表し、これを透過率相当量と呼ぶ。また、透過率相当量は、画像メモリに記憶されているのでカラー画像として見ることができる。透過率相当量の画像を透過率画像と呼ぶ。

各色成分の透過率相当量は、

$$R0(m,n) = (R3(m,n) \times k) / R2(m,n)$$

$$G0(m,n) = (G3(m,n) \times k) / G2(m,n)$$

$$B0(m,n) = (B3(m,n) \times k) / B2(m,n)$$

で求められる。C0 (R0, G0, B0) がカラーの透過率画像である。(フォイルゲン物質の吸光度を求めるのに必要なのはG, B成分の透過率であるが、透過率画像をカラー画像として見ることができるようR成分についても演算を行っている。)

(3) 細胞核の抽出

フォイルゲン物質の吸光が大きく反映されているG成分 (G0プレーンの透過率画像) について、しきい値 t (0 < t < k) で透過率相当量が [0 ~ t] の画素を二値化し、測定対象である細胞核を抽出する。抽出した細胞核の像は、二値画像メモリに記憶する。

細胞核の二値画像を透過率相当量のカラー画像に重ねて表示し、二値画像処理機能により核の取捨選択、修正を行う。

(4) 吸光度の計算, 核内吸光度の和のデータ出力

細胞核内の各画素についてG, B成分の透過率相当量から吸光度を求め、細胞核ご

とに吸光度の和を出力する。

透過率 T と吸光度 A の関係は、

$A = -\log T$ だから、画素 (m,n) の吸光度 $A(m,n)$ は、 (m,n) の透過率相当量を $T'(m,n)$ とすると

$$A(m,n) = -\log (T'(m,n) / k)$$

となる。したがって、 G 、 B 成分の吸光度はそれぞれ

$$AG(m,n) = -\log (G0(m,n) / k)$$

$$AB(m,n) = -\log (B0(m,n) / k)$$

で計算される。こうして求められた細胞核内画素の吸光度 AG_i 、 AB_i を各々の細胞核で総和して AG 、 AB とする。

$$AG = \sum AG_i$$

$$AB = \sum AB_i$$

ここで i は細胞核内の画素数で、座標 (m,n) の数に等しい。得られた細胞核ごとの AG 、 AB をデータファイルに出力する。

(5) DNA量の算出

データファイル中の核内吸光度の和 AG 、 AB に対して、前章で述べた非特異的光喪失を除去する補正を行い、その結果をDNA量（の相対量）とする。すなわち、

$$\text{DNA量} = (AG - \gamma AB) / (1 - \beta \gamma)$$

である。

3-2. 測定手順

実際の測定手順を Fig.3-2 に示す。

(1) 背景画像の入力

測定対象の含まれる標本（スライド）上の細胞が全く含まれていない視野を背景画像 $C2$ として入力し、 $R \cdot G \cdot B$ の各成分の画像を保存する。

(2) 対象画像の入力

測定対象（すなわち細胞の核）を含む画像を同様にC3に入力する。

(3) 透過画像の作成

画像間演算により透過率画像C0を作成する。

$$R_0 = R_3 \times k / R_2$$

$$G_0 = G_3 \times k / G_2$$

$$B_0 = B_3 \times k / B_2$$

(4) 二値画像の作成

測定領域（すなわち細胞の核領域）を限定した二値画像を作成する。

(5) 核DNA量の計算

二値画像の各核領域について、透過率から吸光度を算出、総和して核DNA量（の相対量）とする。

計測数が予定数に達するまで(2)～(5)を繰り返す。

第4節 理論の実証

4-1. 目的

本節では、まず、カラー画像解析装置を用いた顕微測光法の理論に基づいて細胞の核DNA量を測定するための装置の構成、測定のアプローチ・手順を検討してきた。次に、実際にこのシステムを用い、理論の実証を試みた。具体的には、1) 非特異的光喪失を除去するための係数 γ を実験的に求めた。2) 今回考案した細胞核DNA量の測定法の系統誤差の有無、精度を評価するために、ヒトのリンパ球、好中球、及び、精子の核DNA量を測定した。測定法に系統誤差が内在していても、均質な対象を測定した場合、その系統誤差は表面化しない。そこで、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、比較した。また、定量的な再現性(linearity)を検討するために、リンパ球の核DNA量とその丁度半分のDNA量を持つ精子のDNA量を測定し、比較した。3) 今回新たに考案したカラーカメラの色成分（広波長フィルター）を利用したフォイルゲン物質の定量法の妥当

性を調べるために、干渉フィルター(band-pass filter)を用いてリンパ球、好中球の核DNA量を測定し、比較した。

精度の指標としては、変動係数(CV, coefficient of variation)を算出した。
(%CV = (標準偏差/平均値) × 100)

4-2. 材料・方法

a) 系統誤差・精度の検討

健康成人の末梢血から、リンパ球抽出液(Ficoll-Paque; Pharmacia, Sweden), 単球・好中球分離液(Mono-Poly; Flow Laboratories, UK)を用いて、リンパ球、好中球を分離・採取し、RPMI-1640(日水製薬)で希釈、浮遊液とした。また、健康成人男子の精液をRPMI-1640で希釈した。

a-1) リンパ球と好中球を、a-2) リンパ球と希釈精液を混合し、適当な濃度の浮遊液とした後、自動塗抹標本作製装置(Auto Smear CF-12SB; サクラ精機)を用いて、スライドガラス上に塗布。

メタノール-ホルマリン-酢酸固定液(容積比85:10:5)を用いて、室温で1時間固定した。

b) フォイルゲン染色法

固定した標本に以下の手順でフォイルゲン染色を行った。

- (1) 固定液を洗い流すために、蒸留水で洗浄。
- (2) 4N塩酸で加水分解。(30℃, 最長30分間)
- (3) 0.1N塩酸に5分間浸漬。(室温)
- (4) シッフ試薬(Sigma, USA)でフォイルゲン染色。(室温, 遮光, 90分間)
- (5) 亜硫酸水を通す。(5分間×3回)
- (6) 流水水洗。(10分間)
- (7) アルコール, キシレンの脱水系列を通した後,

Eukitt (O.Kinder, Germany) で封入。

尚, γ 決定の為に標本の一部は上記手順のシッフ試薬の処理段階だけを省き、未染色の標本とした。

c) 画像解析法による測定

考案したカラー画像解析システムを用い、前記の測定アルゴリズム・手順に従い、以下の計測を行った。

c-1) γ の決定

未染色標本を用い、核領域のG成分、B成分の吸光度を計測した。この時、第2章の式(10)

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

の値は0になるはずだから、 γ はG成分の吸光度とB成分の吸光度の比として求めることができる。そこで、(1)核領域の画素ごとに $\gamma = A_b / A_g$ を求め、個々の核領域内の γ の平均を算出し、(2)さらに計測した全ての核について、その平均を求め、これを測定した標本の γ とした。

以下の測定ではこの値を用いて、核DNA量を算出した。

c-2) 系統誤差の有無・精度の評価

c-2-1) リンパ球と好中球の核DNA量の測定

同一標本上のリンパ球と好中球の核DNA量を測定し、測定値(それぞれの平均DNA量)に有意な差があるかを検討した。

c-2-2) リンパ球と精子の核DNA量の測定

同一標本上のリンパ球と精子のDNA量を測定し、定量性を検討した。

c-3) 干渉フィルターを用いた核DNA量の測定

この装置の光路に 550 nm 及び 450 nm の干渉フィルター(*)を入れて、顕微分光測光法に準ずる方法(藤田らの二波長測光法, 20-22, 26-28, 30, 33, 34)でリンパ球, 好中球のDNA量を測定した。

(*) この際、用いたフィルターの特性値は以下の通り。

peak wavelength; 451.4 nm	bandwidth; 9.7 nm
peak wavelength; 550.8 nm	bandwidth; 9.7 nm

4-3. 結果

1) γ の決定

2つの未染色標本を用いて、核領域のG成分、B成分の吸光度相当量 A_g , A_b を測定して、その γ を算出した(表3-1)。いずれの標本においても、リンパ球の γ の方が好中球の γ よりも小さい傾向があった(標本1では有意差あり)。リンパ球と好中球のデータを併せて、その標本としての γ とすると、標本間に有意水準5%で有意な差はなかった。

細胞の種類や形状等により、 γ が異なる可能性は否定できないが、今回は、測定した全データから算出した γ の値 $0.778 (\pm 0.101)$ を以後の核DNA量の算出に使った。

2) 系統誤差・精度の評価

2-1) リンパ球と好中球の核DNA量の比較

リンパ球、好中球の核DNA量の測定結果を表3-2に示す。同一標本上のリンパ球と好中球の核DNA量(平均)の比は、 $0.98 \sim 1.01$ でほぼ1に近い値が得られたが、統計学的には標本1, 3で有意差(有意水準0.05)があった。

変動係数(%CV, coefficient of variation)は、リンパ球で $4.61 \sim 5.09$ 、好中球で $2.69 \sim 4.53$ であった。

2-2) リンパ球と精子のDNA量の比較

リンパ球、精子の核DNA量の測定結果を表3-3に示す。理論的には、リンパ球と精子のDNA量の比は2になるはずであるが、今回の測定結果では、その比の平均は 2.03 (範囲; $2.00 \sim 2.16$)であった。

%CVは、リンパ球で $4.13 \sim 5.25$ 、精子で $6.03 \sim 13.55$ と精子の測定値のばらつきが大きかった。

2-3) 干渉フィルターを用いたリンパ球と好中球の核DNA量の測定

550 nm , 450 nm の干渉フィルターを用いて測定したリンパ球と好中球の核DNA量を表3-4に示す。

同一標本上のリンパ球と好中球の核DNA量(の平均)の比は、 $1.00 \sim 1.06$

で、統計学的には標本4で有意差（有意水準0.05）があった。

%CVは、リンパ球で5.06～6.14、好中球で4.74～8.04と、干渉フィルターを使わない時と大差なかった。

4-4. 考察

1) γ の決定

2つの未染色標本を用いて、核領域のG成分、B成分の吸光度相当量 A_g 、 A_b を測定して、 γ (0.778 ± 0.101)を決定したが、いずれの標本においても、リンパ球の γ の方が好中球の γ よりも小さい傾向があった。これは、核の形態・厚さによる光学的な誤差に起因すると考えられる。画像解析法において、この影響がどの程度なのか、またそれは補正できるものなのかは、今後、検討する必要がある。

2) 系統誤差・精度の評価

(1) 同一標本上のリンパ球と好中球の核DNA量（平均）の比が、平均1.00（範囲；0.98～1.01）であること、(2) リンパ球と精子のDNA量の比の平均が、2.03（2.00～2.16）であること、(3) 変動係数（%CV）が、リンパ球で4.13～5.25、好中球で2.69～4.53であること、(4) リンパ球と好中球の測定結果が、干渉フィルターを用いて測定した結果と大差ないことから、今回考案した細胞核DNA量のカラー画像解析法の定量性は、実用に耐える範囲にあると考えられる。

理論的には、リンパ球と好中球のDNA量の比は1に、リンパ球と精子のそれは2になるはずであるが、実際には厚さや染色性が一定といった理想的な標本をつくることは困難である。相対的に精子のDNA量が過小評価される傾向があるが、これは、1) 精子ではDNAの密度が高く、リンパ球等と同じ条件で加水分解、染色すると濃染してしまい、濃度誤差の影響が生じるため(3,32)と、2) 精子の面積が小さいために、相対的に分布誤差（またはresidual distributinal error）の影響が大きくなるため(31,32)と考えられる。これらの誤差はいずれもDNA量の見積りを低くする。精子で測定誤差が大きいことは、リンパ球や好中球と比べてDNA量のばらつき（%CV）が大きいという測定結果からも推測される。

表 3-1 γ の測定

Sample No.	Type of cells measured	No. of cells measured	γ
1	Lymphocytes	99	0.767 \pm 0.116 *
	Neutrophils	30	0.807 \pm 0.062
	(total)	129	0.777 \pm 0.107
2	Lymphocytes	120	0.768 \pm 0.092
	Neutrophils	134	0.789 \pm 0.103
	(total)	254	0.779 \pm 0.098
1+2	(total)	383	0.778 \pm 0.101

* $p < 0.05$

表 3-2 リンパ球と好中球の核DNA量

Sample No.	No. of cells measured	Nuclear DNA Content (%CV)	Nuclear Area (μm^2)	
1	Lymphocytes	120	67.04 \pm 3.41 (5.09)*	23.23 \pm 3.04
	Neutrophils	148	68.29 \pm 2.10 (3.08)	70.01 \pm 9.19
	(Ratio L/N)		0.98	
2	Lymphocytes	514	67.42 \pm 3.11 (4.61)	22.78 \pm 3.46
	Neutrophils	511	67.34 \pm 1.81 (2.69)	64.27 \pm 9.09
	(Ratio L/N)		1.00	
3	Lymphocytes	510	65.96 \pm 3.17 (4.82)*	23.51 \pm 3.22
	Neutrophils	507	65.24 \pm 2.96 (4.53)	63.76 \pm 10.18
	(Ratio L/N)		1.01	

* $p < 0.05$

表 3-3 リンパ球と精子のDNA量

Sample No.		No. of cells measured	Nuclear DNA Content (%CV)	Nuclear Area (μm^2)
1	Lymphocytes	59	37.71 \pm 1.58 (4.19)	26.77 \pm 5.09
	Sperm	122	18.66 \pm 1.29 (6.92)	8.46 \pm 0.83
	Ratio L/S		2.02	
2	Lymphocytes	54	37.10 \pm 1.53 (4.13)	30.14 \pm 6.29
	Sperm	41	18.27 \pm 1.10 (6.03)	8.99 \pm 8.99
	Ratio L/S		2.03	
3	Lymphocytes	47	39.77 \pm 1.85 (4.64)	27.95 \pm 5.78
	Sperm	136	18.42 \pm 1.42 (7.73)	8.08 \pm 0.92
	Ratio L/S		2.16	
4	Lymphocytes	60	38.25 \pm 2.01 (5.25)	24.29 \pm 2.95
	Sperm	80	19.17 \pm 2.59 (13.6)	8.21 \pm 1.42
	Ratio L/S		2.00	

表 3-4 干渉フィルターを用いたリンパ球と好中球の核DNA量の測定

Sample No.		No. of cells measured	Nuclear DNA Content (%CV)
1	Lymphocytes	230	34.50 ± 1.79 (5.19)
	Neutrophils	255	34.53 ± 1.79 (5.18)
	Ratio L/N		1.00
2	Lymphocytes	72	34.76 ± 1.76 (5.06)
	Neutrophils	74	34.37 ± 1.63 (4.74)
	Ratio L/N		1.01
3	Lymphocytes	522	33.73 ± 2.07 (6.14)
	Neutrophils	506	33.60 ± 1.75 (5.21)
	Ratio L/N		1.00
4	Lymphocytes	539	34.65 ± 1.82 (5.25)
	Neutrophils	523	32.72 ± 2.63 (8.04) *
	Ratio L/N		1.06

* p<0.05

第5節 小 括

前章の細胞核DNA量のカラー画像解析装置を用いた顕微測光法の理論に基づいて、実際に核DNA量を測定するための装置の構成、測定のアプローチ・手順を検討した。この際、TVカメラとしては、CCDカメラを用いて構成したが、この構成で1画素の大きさは光学顕微鏡の最大分解能に相当する大きさであり、顕微測光の限界内で分布誤差が最小となりえる大きさと考えられた。

次に実際に測定を行い、以下の結果を得た。

1) γ の決定

2つの未染色標本を用いて、核領域のG成分、B成分の吸光度 A_g 、 A_b を測定して、 γ を決定した (0.778 ± 0.101)。

2) 系統誤差・精度の評価

1) 同一標本上のリンパ球と好中球の核DNA量(平均)の比が、平均1.00 ($0.98 \sim 1.01$) であること、2) リンパ球と精子のDNA量の比の平均が、2.03 ($2.00 \sim 2.16$) であること、3) 変動係数(CV)がリンパ球で4.13 \sim 5.25、好中球で2.69 \sim 4.53 であること、4) リンパ球と好中球の測定結果が、干渉フィルターを用いて測定した結果と大差ないこと、により、今回考案した細胞核DNA量のカラー画像解析法の定量性は、実用範囲にあることが示された。また、従来の顕微分光測光によるデータと比較しても良好である(31,32)。

以上、本理論に基づく細胞核DNA量の顕微測光システムは、細胞核DNA量の解析に実用可能であることが示された。

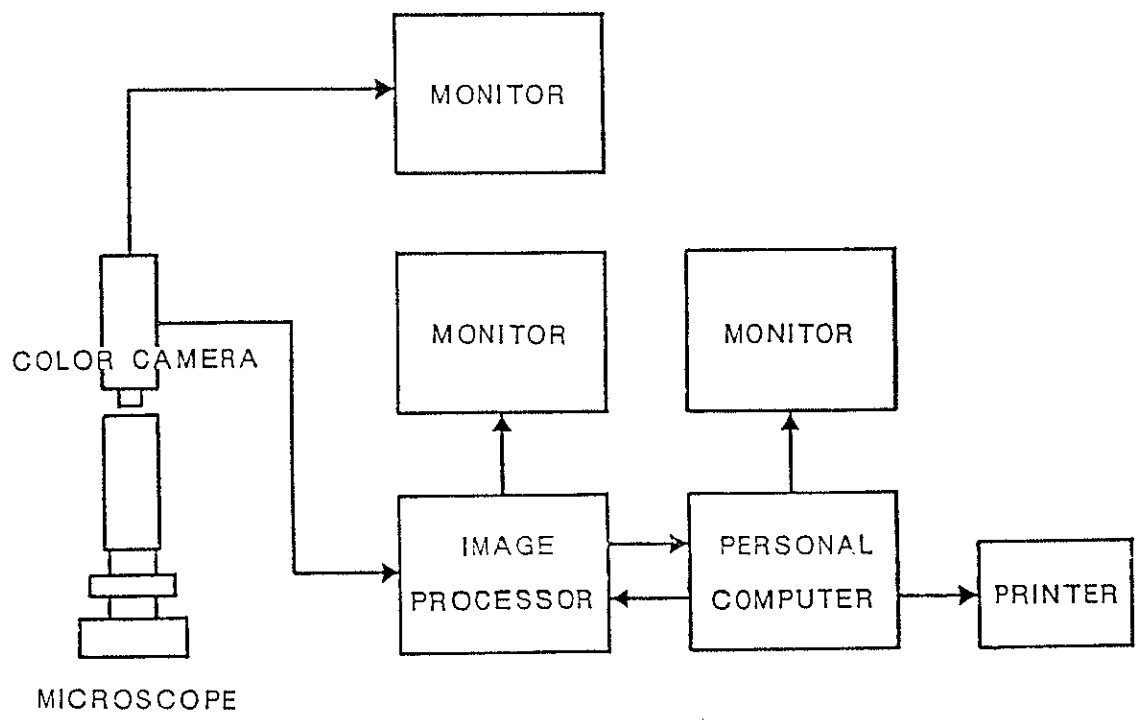


Fig. 3-1 Hardware of color image analysis system.

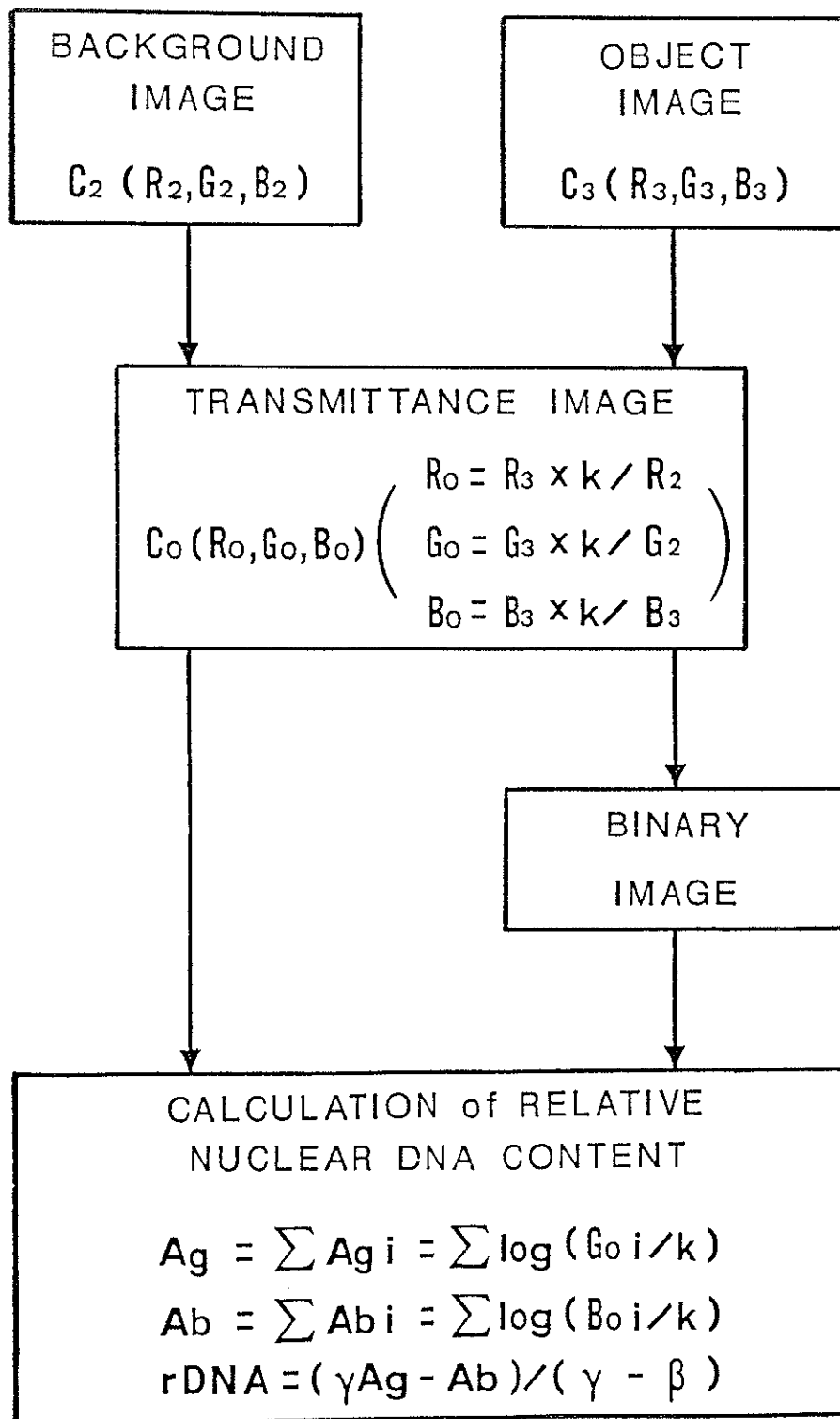


Fig. 3-2

Procedure of measurement of nuclear DNA contents
in color image analysis system.