

## 有核赤血球を用いた小核試験における 画像解析法の導入

うえだ ひろゆき いちかわ たかし たか いあきのり  
上田 博之・市川 隆司・高井 明德

### 要 旨

水環境中における変異原物質の汚染を広くモニタリングする目的で有核赤血球を持つ水生生物を用いる小核試験の適用が期待されているが、小核は低頻度でしか現れないので10,000個レベルでの観察が必要になる。そこで小核試験を効率的に行うために画像解析による赤血球数の自動算定を試みた。

簡便性、汎用性を重視し、デジタルカメラで撮影された画像から短時間で算定できる方法を提案し、撮影の解像度やファイル保存時の非可逆型高圧縮形式が自動算定の精度に及ぼす影響を検討した。

高圧縮形式で保存された画像を展開し、256階調のグレースケールに変換し、適当な階調度を閾値にして二値化処理を行い、赤血球の各部分を粒子領域と判別させて算定した。小核の検出に効果的なアクリジン・オレンジ染色された染色体における核領域の階調度は、撮影時の解像度や保存時の圧縮率に関わらず均質であり、自動算定に適当であることが示された。

さらに10,000個程度の観察を必要とする小核試験が最も効率的に行える条件として、対物レンズの倍率が20倍で高解像度(1721×1368画素)撮影された画像の適用が示された。この条件では、1画像で900程度の赤血球数を90%程度の算定精度で算定でき、かつ小核の観察が可能である。

### 1. はじめに

小核試験は染色体異常の間接的な検出法として、観察が容易かつ簡便である上に結果の信頼性も高いことなどから、変異原性を検出するための遺伝毒性試験の一つとして化学物質の安全性評価に広く用いられている<sup>1, 2)</sup>。最近、水環境中における変異原物質の汚染を広くモニタリングするために、小核試験の水生生物への応用が進められるようになり、その多くが魚類を用いた小核試験である<sup>3, 4)</sup>。魚類の小核試験は一般に赤血球を用いて行われているが、汚染水中に変異原物質が含まれていたとしても低濃度であるので、小核頻度が低く、結果を評価するためには個体当たりの観察数は少なくとも10,000個程度が望まれる<sup>5)</sup>。

最近、哺乳類の標本を対象にした画像解析による自動観察装置が製作され利用されており<sup>6)</sup>、魚類への適用も期待される<sup>3)</sup>。しかし、魚類は有核赤血球で、赤血球のサイズも小さく、核の近傍に現れる小核も小さいので自動観察が容易ではない。むしろ、小核自体の観察は容易であるので、観察視野における赤血球数だけ自動的に算定されれば、観察効率は飛躍的に向上する。そこで、赤血球数の自動算定を行うための画像解析法について検討したので報告する。

本報告では、小核試験が容易かつ簡便に実施できるように、特殊な機器ではなく、簡易

なデジタルカメラで撮影した画像を利用することを前提にした。デジタルカメラによる撮影画像において撮影時の解像度や画像ファイル保存時の圧縮が画像解析に影響する。一般的にデジタルカメラでは撮影した画像をJPEG方式の圧縮をかけてファイルに保存する。

JPEGはファイル圧縮の際に重要度が低い情報を捨ててしまう非可逆型圧縮であり、圧縮したファイルを展開しても圧縮前の画像とは一致しないという性質を持っている。このため、細かい線などのデータはつぶれてしまうので、画像解析を行うためには適さない。しかし、本試験のようにフィールド調査もしくは広域ネットワークで転送して短時間で赤血球数を算定する利用方法を考えれば、一般的で高圧縮率をもつJPEG方式を利用すべきである。

そこで、本報告では、デジタルカメラで撮影して高圧縮保存された一般的なデジタル画像を用い、フリーウェアのアプリケーションソフトウェアで赤血球数を算定する方法を提案し、その際に対物レンズの倍率と撮影時の解像度が算定精度に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料と方法

### 1) 標本作成

資料標本としてメダカの末梢血の塗抹標本を用いた。塗抹標本は、魚体尾柄部よりヘパリンで内壁を濡らした注射器で採取した末梢血を、直前にスライドガラス上に1滴滴下した牛血清に混合するように1滴滴下し、カバーガラスで細胞層が1層になるように塗抹して作製した。標本は翌日99%メチルアルコールに5分間浸し、固定した。

標本の染色はアクリジン・オレンジ染色法により行い<sup>7)</sup>、蛍光顕微鏡で観察した。染色液はpH 6.8のリン酸緩衝液で希釈した40  $\mu\text{g/ml}$ の濃度のものを用い、染色は簡便法に

より、染色液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて染色し、観察用とした。

### 2) 画像解析

蛍光染色した標本を顕微鏡用デジタルカメラPD-11(オリンパス製)を使用して撮影した。各対物レンズの倍率を20倍と40倍に変えて同一観察視野を2種の解像度(1712 $\times$ 1368、640 $\times$ 512)で撮影した。撮影した画像は、圧縮率の異なる2種のJPEG形式および無圧縮のTIFF形式でファイルを保存してパーソナルコンピュータに転送した。

画像中の赤血球数の算定方法として、赤血球の核をパーソナルコンピュータにインストールされた画像解析ソフトウェアScion Image(Scion Corporation)を用いて解析する方法を適用した。自動算定は、塗抹された赤血球の核とその他の部分の濃度における差異を判別することによる。

塗抹、倍率、解像度など本実験での環境における自動算定の可能性を、塗抹された核の濃度の均一性により検証する。そのため、2組4枚(倍率2組、解像度2組)の各画像における周辺部分から8つの核を選択し、各画像で対応する核の平均濃度と変動係数について比較検討した。すなわち、2種の各倍率で同一観察視野における解像度の異なる2つの画像に撮影された8つの同じ位置に存在する核の平均濃度と濃度分布を比較することにより検討した。

また、対物レンズの倍率、解像度が算定精度に及ぼす影響を検討するために、上述の4条件(倍率2組、解像度2組)で各7標本を撮影し、肉眼による実測数に対する自動算出数の比率を比較した。

### 3) 統計処理

同一観察視野の画像における8つの核の平均濃度および変動係数に見られる差異は反復測定分散分析、対物レンズの倍率と解像度

が算定精度に及ぼす影響は二元分散分析で行った。いずれの検定もSPSS(SPSS Japan Inc.)を用いて有意水準は5%に設定した。

### 3. 結果と考察

Fig. 1に本研究で用いたアクリジンオレンジ染色を行った赤血球を示す。アクリジンオレンジ染色では、DNA領域である核は緑色に染色され、ほぼ均質に高いコントラストで染色されるので、小核の検出は通常のギムザ染色に比べ容易であり、高い精度で検出できる。

Scion Imageにより赤血球の核を算定するためには、画像の核部分を適当な濃度領域に当てはめるか、もしくは白黒に二値化して核以外の領域と分離する必要がある。本報告では、二値化して核を粒子領域として区別して、それらの数を算定する方法を提案する。

まず、コンピュータに転送されたJPEG形式の画像ファイルをTIFF形式に変換した。これらのファイルをScion Imageで開き、256階調のグレースケールに変換した。染色された標本画像において、赤血球の核部分は白黒階調が高く、赤血球以外の部分は白黒階調が低くなった(Fig. 2)。

本ソフトウェアでは、白黒階調の高い領域を粒子領域として数えることができるので、グレースケール画像を白黒反転した(以

降、操作コマンドを示す:Edit-Invert)。256階調の適当な閾値を指定することにより、核部分を黒に、その他の部分を白に変換できる(Option-Threshold)。

事前に核のおおよその大きさを測定し、オプション設定(Analyze-Analyze Particles)で算定の対象となる核部分の大きさ(面積)の範囲を指定することにより、画像上の核以外で同じ階調度の不要部分を除去することができる。また、隣接する赤血球の細胞質の重なりから複数個の核を1つの粒子として数えることがある。数えられた各核の面積や周囲長の表示(Analyze-Show Results)により、これらの算定ミスを確認することができる。

測定後、これらの数値を用いて、測定個数の補正を行う。なお、JPEG画像のファイルサイズは1712×1368画素が約550KB、640×512画素が約140KBであり、それらをTIFFに変換することによってそれぞれ約6.9MB、約980KBになる。これら一連の操作による1つの画像の算定に、約6.9MBの画像ファイルの使用した場合で2～3分を要する。

自動算定を正確に行うためには、画像全体に点在する核部分の濃度が核以外の領域と異なる階調度を持ち、かつ均一であることが望ましい。標本の塗抹状態、対物レンズの倍率、撮影解像度などの本測定環境において自動算定の可能性を検証するために、各画像の周辺

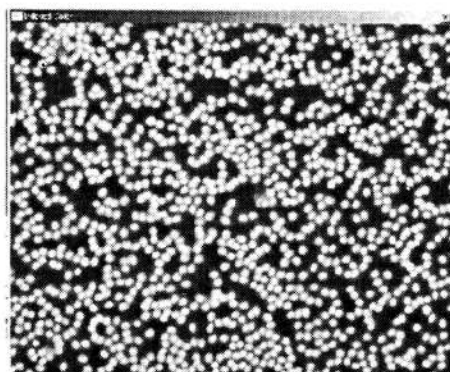


Fig. 1 標本画像(20倍)

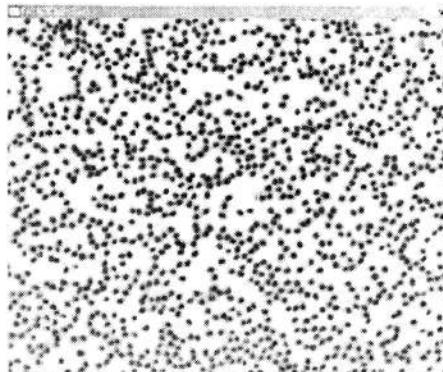


Fig. 2 白黒反転画像

部から無作為に抽出した8つの核内部の階調度測定して、それらの平均濃度を算出した。その結果、解像度の小さい画像は、TIFF画像および解像度の大きいJPEG画像に比べて白黒反転後画像における核部分の階調度が有意に高くなることが認められた( $p < 0.05$ )が、変動係数にはいずれの倍率においても差は認められなかった(Table 1)。

核部分の階調度は解像度により変化するものの、画像全体の平均階調度(6.8~48.5)と比較して十分に大きく、また、変動係数から濃淡の程度は20~40倍程度の対物レンズの倍率、解像度や圧縮により変化しないことが確認された。すなわち、本条件の範囲では、適当な階調度を閾値に設定することで核部分の自動識別が対物レンズの倍率、解像度、保存時の圧縮に影響されることなく可能であることが示された。

次に対物レンズの倍率と画像解像度が算定精度に及ぼす影響を見るために、対物レンズ

20倍と40倍、解像度1712×1638画素と640×512画素の各7画像、合計28画像について画像解析ソフトウェアを用いて上述の方法で赤血球数の算定を行った。二値化の閾値は、便宜上画像ごとに無作為に10個の核を抽出してそれらの平均濃度を測定し、その階調度から標準偏差を引いた値に設定した。

赤血球数の算定率は、元の画像を用いて肉眼で数えた数に対する二値化による自動算出数の割合とした。得られた算定数ならびに算定率をFig. 3、Fig. 4に示す。算定率に関する二元分散分析の結果、レンズの倍率と解像度に交互作用が認められたために( $p < 0.05$ )、4条件の算定数を一元分散分析で比較した。その結果、高倍率(40倍)・高解像度(1712×1368)の場合に算定率が有意に小さくなることが認められた。これは、高倍率時には1つの核の面積が大きく、解像度が高いために細胞質の重なりが核の階調度と同等になり複数個を1つに算定したことや、画像全体の階調

Table 1 各倍率、解像度の画像における各部分の解像度と変動係数(平均値±標準誤差)

対物レンズ	解像度	保存形式	階調度	変動係数
20倍	640 × 512	JPEG	90.0 ± 13.9*	18.6 ± 1.9
	1712 × 1368	JPEG	85.9 ± 15.3	20.5 ± 1.6
	1713 × 1368	TIFF	84.4 ± 15.2	18.4 ± 1.7
40倍	640 × 512	JPEG	131.7 ± 17.3*	13.4 ± 1.2
	1712 × 1368	JPEG	124.2 ± 18.4	14.3 ± 1.1
	1712 × 1368	TIFF	120.6 ± 18.5	15.9 ± 1.6

(\* $p < 0.05$ )

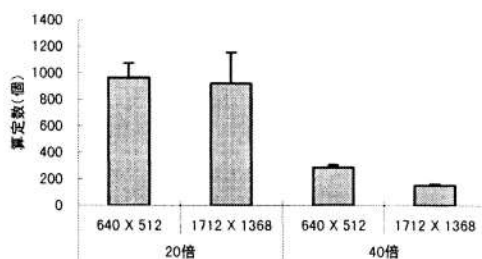


Fig. 3 各倍率および解像度の算定数

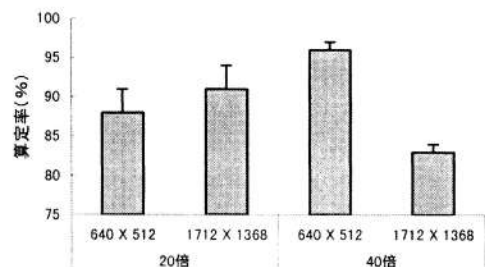


Fig. 4 各倍率および解像度の算定率

度のばらつきが大きい場合には1つの核が通常の面積より小さい粒子領域となって算定から除外されたためである。

これらのことは、今回便宜上設定した閾値を適切にすることによって高い算定率を得ることができると予測されるが、今後設定閾値に関して検討が必要である。

以上のように、画像解析ソフトウェアを利用して、短時間にメダカの末梢血の塗抹標本

で赤血球数を算定することが可能であると考えられる。対物レンズの倍率は20倍の設定により90%程度の精度で赤血球数を算定ことができ、1画像で900程度の赤血球を算定できる。したがって、10,000個の赤血球を観察するために1検体あたり十数枚の画像で調査できる。

一方、このシステムを小核試験に適用する場合、赤血球の効率的な算定と共にディスプレイ上で小核の検出が可能な条件で適用しなければならない。小核は、核と同色、同濃度で染色され、核の周辺に現れる輪郭が明瞭な球状の小体として認められる。小核の検出に関しては、一般的に認められるサイズの小核に関して直接顕微鏡観察した場合、対物レンズが40倍の倍率では小核が明瞭に検出できるが、20倍では小核の観察は困難であった。しかし、ディスプレイ上の画像では、20倍で撮影した高解像度の画像についても問題なく小核を観察することができた。ただし、低解像度の画像では小核の観察は困難であった (Fig. 5)。

今回の結果から、魚類を用いる小核試験については、対物レンズの倍率を20倍に設定して高解像度で撮影した画像の画像解析による赤血球数の自動算定により効率的な分析ができることが示された。今回の研究では魚類の赤血球を扱ったが、哺乳類以外の脊椎動物の有核赤血球に適用できると考えられる。

#### 文 献

- 1) Schmid W. : The micronucleus test, *Mutation Res.* **31**, 9-15(1975)
- 2) 林 真 : 小核試験, サイエントリスト社 (1991).
- 3) 林 真 : 小核試験による評価法, 水環境学会誌, **19**, 775-779(1996)
- 4) Al-Sabti K., Metcalfe C. D. : Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutation Res.* **343**, 121-135(1995)
- 5) 高井明徳, 石川 卓, 林 真, 上野紘一 : フナおよびオイカワの赤血球を用いた小核試験

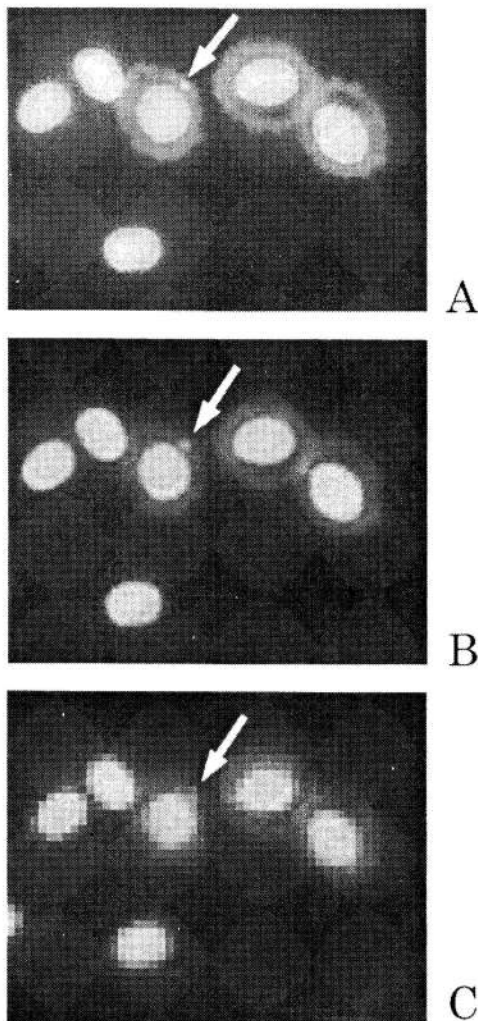


Fig. 5 赤血球における小核(矢印)  
A : 40倍高解像度撮影、B : 20倍高解像度撮影、  
C : 20倍低解像度撮影(倍率は対物レンズ)

- による河川の汚染モニタリングの適用の可能性, *生活衛生*, **47**, 17-23(2003)
- 6) Asano, N., Katsuma, Y., Tamura, H., Higashikuni, N. and Hayashi, M. : An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay : computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells. *Mutation Res.* **404**, 149-155(1988)
- 7) Hayashi M., Sofuni T., Ishidate Jr. M. : An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.* **120**, 241-247(1983)

(受理 2003年2月22日)