

# NIH Imageのマクロによる 共焦点レーザー顕微鏡の画像解析

齋藤 勇

## Image Analysis of Confocal Laser Scanning Microscope by the Macro Command with NIH Image

Isamu SAITO

Digital images of confocal laser scanning microscope were analyzed by using several macro commands with NIH Image software to reveal the influence of He-Ne laser irradiation on the cytoplasmic organelles in MC3T3-E1 osteogenic cells.

The mitochondria were stained by commercial fluorescent probes, named MitoTracker™ Green FM and captured with Nikon PCM2000 confocal laser scanning microscope. Then, these mitochondrial images were analyzed by using macro commands such as stack, center point, summed image, protrusion and retraction.

In this paper, it is discussed how exactly to obtain the suitable conditions for processing digital images, such as upper/lower points of a look up table (LUT), range of density slices and smoothing treatment. Furthermore, we recognize that the macro commands with NIH Image software are very useful for analyzing sequential images automatically.

Key words : NIH image, protrusion, retraction, image analysis, macro command

### はじめに

NIH Image<sup>1)</sup>はX線写真などの医療画像を解析するために、National Institute of Health (NIH, USA)で開発されたMacintosh版の画像処理解析ソフトウェアであり、粒子の面積や周長の測定、輝度分布の解析、細胞運動の追跡など、広い用途で全世界の研究者に利用されている。Windows版としては、同等のソフトウェアがScion Imageという名称でScion Corporation (USA)から無料で提供されているが、どちらも対応画像フォーマットの数少なく、解析処理は8 bitに制限されている。

NIH Imageの特筆すべき機能は、PASCAL風プログラミング言語で記述された多様なマクロにより、自動的に様々な解析処理を実行できることにある。

本報告は、レーザー照射による細胞内小器官の動態を解明する目的で、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に得られたミトコンドリアの蛍光画像を、NIH Imageのマクロを用いて解析を試み、その条件と問題点を検討したものである。

### 材料および方法

#### 1. 材 料

細胞：マウス由来骨原性細胞MC3T3-E1

レーザー装置：He-Neレーザー Belbeam  
(Takara Belmont)

共焦点レーザー顕微鏡：PCM2000 (Nikon)

蛍光プローブ：MitoTracker™ Green FM  
(Molecular Probes, Inc.)

コンピューター：Power Macintosh 9600/350  
(Mac OS 9.2)

ソフトウェア：NIH Image (v1.63)

## 2. 画像の取得

細胞を $\alpha$ -MEM培地で24時間培養<sup>2)</sup>した後、蛍光プローブを培地に添加 (200nM) して30分インキュベートした。その後、He-Neレーザーを

培養容器の底から40秒間連続照射し、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に蛍光画像を取得した。

解析に供した画像は、レーザー照射後0～75分まで5分間隔で取得したシリーズから2枚 (48分, 53分) と、レーザー照射後0分～10分まで0.5分間隔で取得したシリーズから16枚であった。

画像の大きさは1,024×1,024 pixel (1 MB), 0～255までの256階調 (8 bit) で、白が「0」、黒が「255」のピクセル情報を有していた。

## 3. 画像の解析方法

2シリーズの画像について、NIH Imageの組み込みコマンドおよびマクロを使用して、以下の

```
Macro 'Protrusion';
var
  i, MyStackID, Image1ID:integer;
  Image2ID, lower, upper:integer;
begin
  {-----Measurement Settings -----}
  SetOptions('Area, Mean, User1');
  WandAutoMeasure(0);
  SetUser1Label('Prot');
  ResetCounter;
  GetThresholds(lower,upper);
  if upper=0 then exit;
  {-----Window Settings -----}
  MyStackID:= PicNumber;
  SelectSlice(1);
  Duplicate('Image1');
  Image1ID:= PicNumber;
  Duplicate('Image2');
  Image2ID:= PicNumber;
  SelectPIC(MyStackID);
  {---Loop for Each Slice Image ---}
  for i:= 1 to (nSlices-1) do begin
    {-----Step 1 -----}
    SelectSlice(i);
    SelectAll;
    Copy;
    SelectPIC(Image1ID);
    Paste;
    SetDensitySlice(lower,upper);
    MakeBinary;
```

```
{-----Step 2 -----}
  SelectPIC(MyStackID);
  SelectSlice(i+1);
  SelectAll;
  Copy;
  SelectPIC(Image2ID);
  Paste;
  SetDensitySlice(lower,upper);
  MakeBinary;
  {-----Step 3 -----}
  SelectPIC(Image1ID);
  SelectAll;
  Copy;
  SelectPIC(Image2ID);
  ScaleMath(0);
  Paste;
  SetOption;
  Subtract;
  {-----Step 4 -----}
  SelectAll;
  Measure;
  rUser1[i] := rArea[i] * rMean[i]/255;
  SelectPIC(MyStackID);
  end;
  {-----Clean-Up Windows-----}
  SelectPIC(Image1ID);
  SelectPIC(Image2ID);
  Dispose;
  Dispose;
end;
```

図1 NIH Image のマクロ “Protrusion”  
PASCAL風プログラミング言語でかかれたマクロ構文の例

方法で解析処理を施した。

- 1) Stack；一連の画像をスタック化する。
  - 2) Average；スタック化された全ての画像を平均化して一枚の像にする。
  - 3) Make Montage；スタック化された画像を指定された枚数毎に並べて一枚の画像にする。
  - 4) Set Scale；単位を「 $\mu\text{m}$ 」に指定し，画像の実測値を入力してスケールを校正する。
  - 5) Invert；スタック化された画像を一枚ずつ白黒反転する。
  - 6) Smooth；スタック化された画像を一枚ずつsmoothingして不要なノイズを除去する。
  - 7) LUT；Upper値とlower値を指定して濃度を調整する。
  - 8) Density Slice；Upper値とlower値を調整して抽出範囲を決定する。
  - 9) Center Point；スタック化された画像を一枚ずつアウトライン化して対象物の重心点を計測する。
  - 10) Summed Image；アウトライン化された画像を重ね合わせて一枚の合成像を作成する。
  - 11) Protrusion；連続する前後2枚の画像間で増加した領域の面積を計測する。
  - 12) Retraction；連続する前後2枚の画像間で減少した領域の面積を計測する。
  - 13) Show Results；計測結果を表示する。
- Protrusionマクロの構文を図1に示した。

## 結 果

### 1. ミトコンドリアの蛍光像

骨原性細胞MC3T3-E1のミトコンドリアを共焦点レーザー顕微鏡で観察すると，核周囲より細胞の長軸方向へ向かって伸びる，短桿状あるいはヒモ状を呈する蛍光像として認められた（図2）。

レーザー照射後48分（図2-a）と53分（図2-b）に取得された2枚の像を観察すると，両者の間にはわずかな像の変化が認められた。Averageマクロを用いて，2枚の画像を重ね合わせ平均化した像においては，やや明度が低くなり不鮮明になったが，像の明らかな差が確認された（図2-c）。

### 2. 解析条件と識別領域

画像の解析は，Look Up Table（LUT）で画

表1 解析条件 LUTとDensity Slice

		Lower	Upper
HIGH	LUT Density Slice	0 10	10 254
OPT	LUT Density Slice	0 110	110 254
LOW	LUT Density Slice	0 210	210 254

表2 各条件のProtrusionとRetraction

LUT&Density Slice	Smoothing	Area	Protrusion	Retraction
HIGH	- +	2213.2 2213.2	111.6 133.5	205.4 132.4
OPT	- +	2213.2 2213.2	89.1 80.4	91.3 85.6
LOW	- +	2213.2 2213.2	63.5 28.6	30.3 35.0

unit:  $\mu\text{m}^2$

レーザー照射後48分と53分の画像における各条件下でのProtrusionとRetraction値の変化

像の濃度を濃くしたものを「HIGH」，薄くしたものを「LOW」，中間のものを「OPT」とし，それに合わせてDensity Sliceで抽出範囲の値を決定した3段階の条件で行った（表1）。

3段階の条件において，Center PointおよびSummed Imageマクロによりアウトライン化して重ね合わせた画像（図2-d）を作成すると，Density Sliceが最も広い範囲の条件「HIGH」では，細かな物体が分離されずに大きな塊の領域として認識されていた（図2-d，上段）。Density Sliceを中間程度とした条件「OPT」においては，適度に微細な領域の識別がされていた（図2-d，中段）。

一方，Density Sliceの範囲が最も狭い条件「LOW」では，認識されずに残っているグレイの領域が多く認められた（図2-d，下段）。

### 3. 解析結果（その1）

画像濃度と抽出範囲を中間の解析条件「OPT」に調整したスタックについて，Protrusion像とRetraction像を作成してみると，2枚の画像の変化した領域のみが黒く塗りつぶされて表示された（図2-e）。上段の図は，2枚目の画像から1枚目の画像を引いたもの，すなわちProtrusion（増

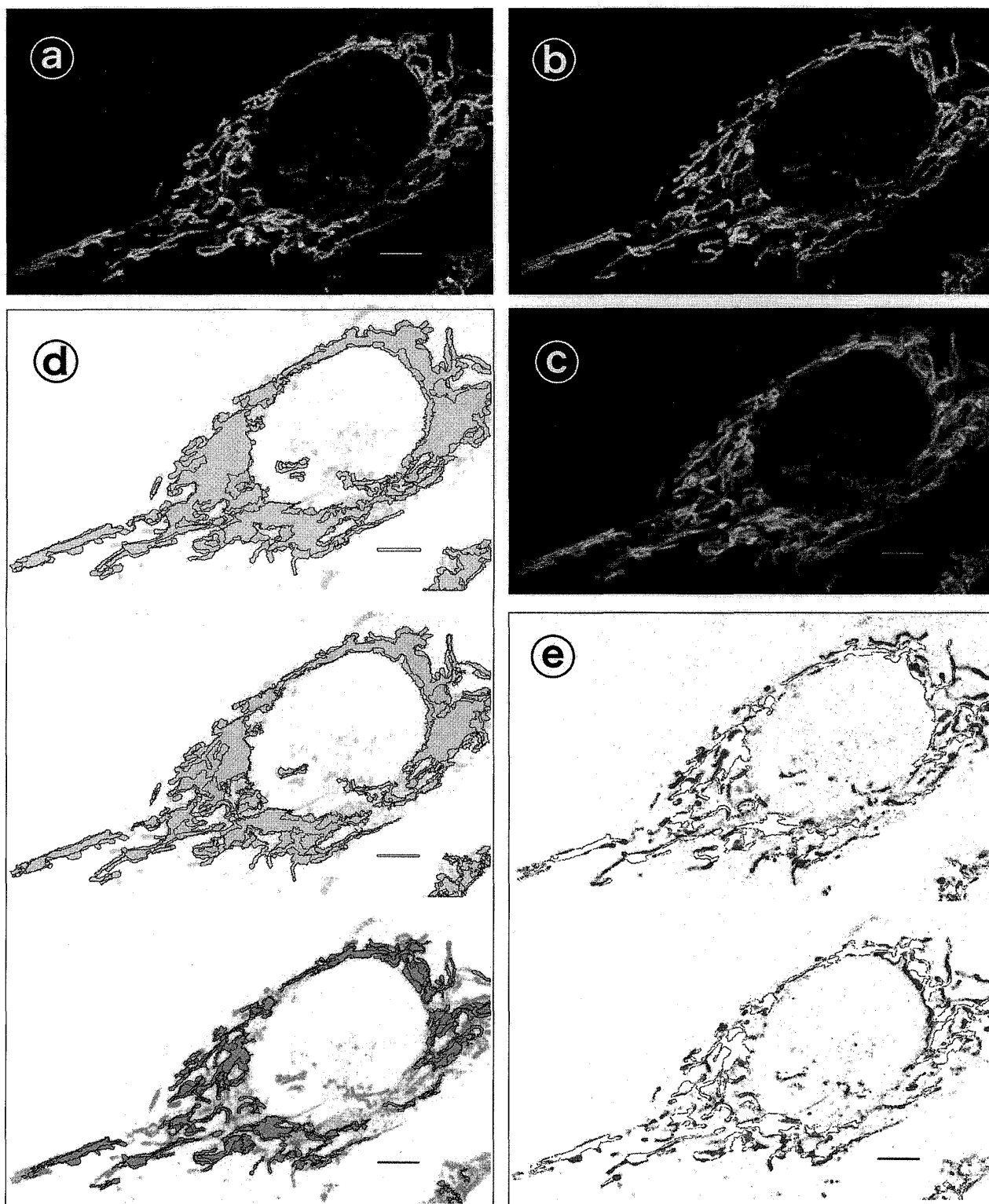


図2 NIH Imageによる画像解析

a ; ミトコンドリアの蛍光像 (He-Neレーザー照射後48分)

b ; ミトコンドリアの蛍光像 (He-Neレーザー照射後53分)

c ; a, bを平均化したAverage像

d ; 3条件で得られたSummed Image像 上段; HIGH, 中段; OPT, 下段; LOW

e ; Protrusion像とRetraction像 上段; Protrusion, 下段; Retraction, Bar= 5  $\mu$ m

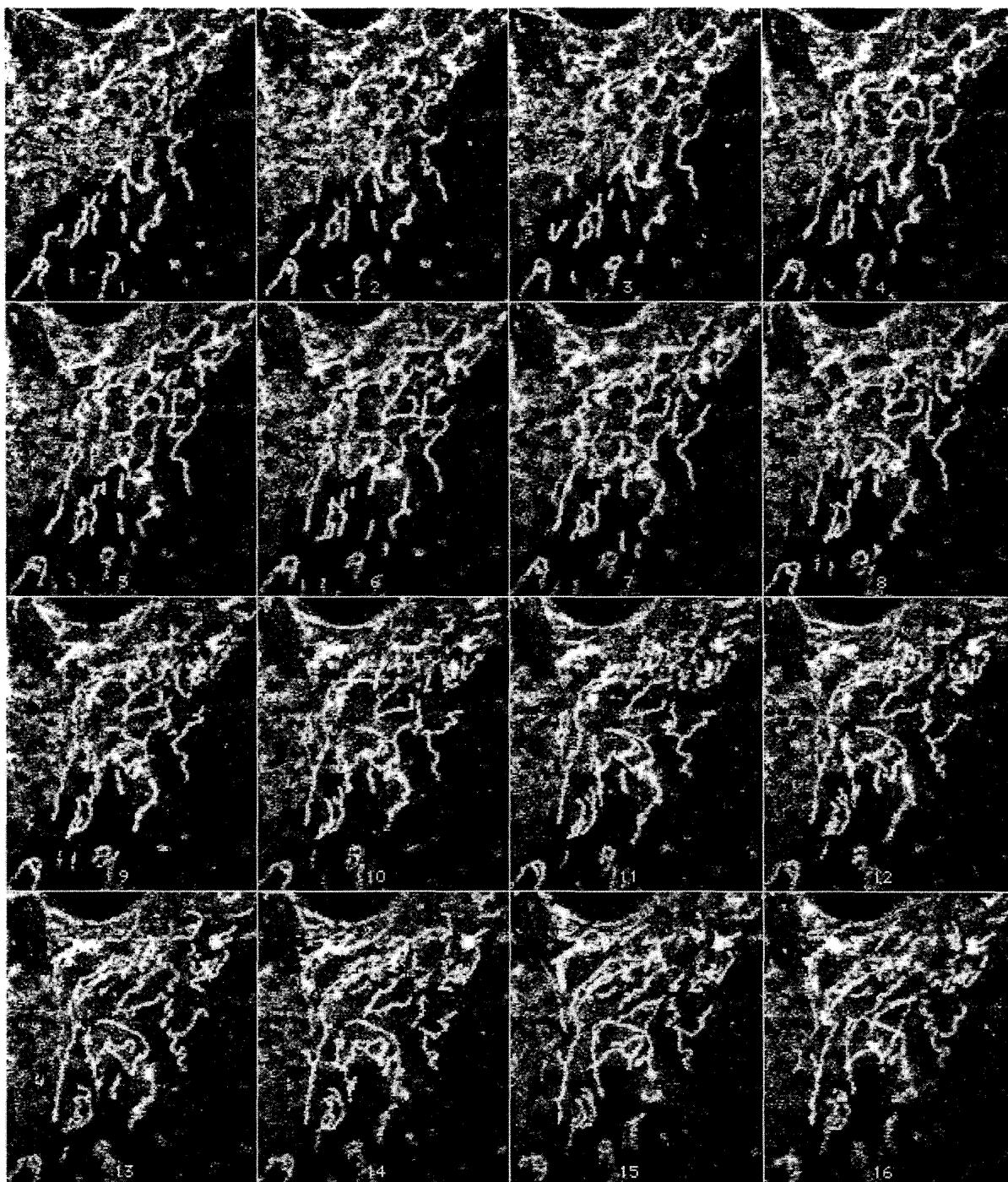


図3 NIH ImageによるMontage像

レーザー照射後0～10分まで0.5分間隔で取得された16枚のMontage像。図中央下よりのミトコンドリアが移動している様子が観察される。

加した領域)で、下段の図は、1枚目の画像から2枚目の画像を引いたもの、すなわちRetraction(減少した領域)である。

ProtrusionおよびRetractionマクロを用いてそれぞれの面積を測定した結果を表2に示した。なお、Areaは測定範囲の面積( $\mu\text{m}^2$ )を示している。

LUTおよびDensity Sliceの条件を変えて計測した結果、Protrusionの面積は、濃い条件「HIGH」では $111.6 \mu\text{m}^2$ 、中間「OPT」では $89.1 \mu\text{m}^2$ 、薄い条件「LOW」では $63.5 \mu\text{m}^2$ であり、smoothing処理した場合は、それぞれの値が「HIGH」 $133.5 \mu\text{m}^2$ 、「OPT」 $80.4 \mu\text{m}^2$ 、「LOW」

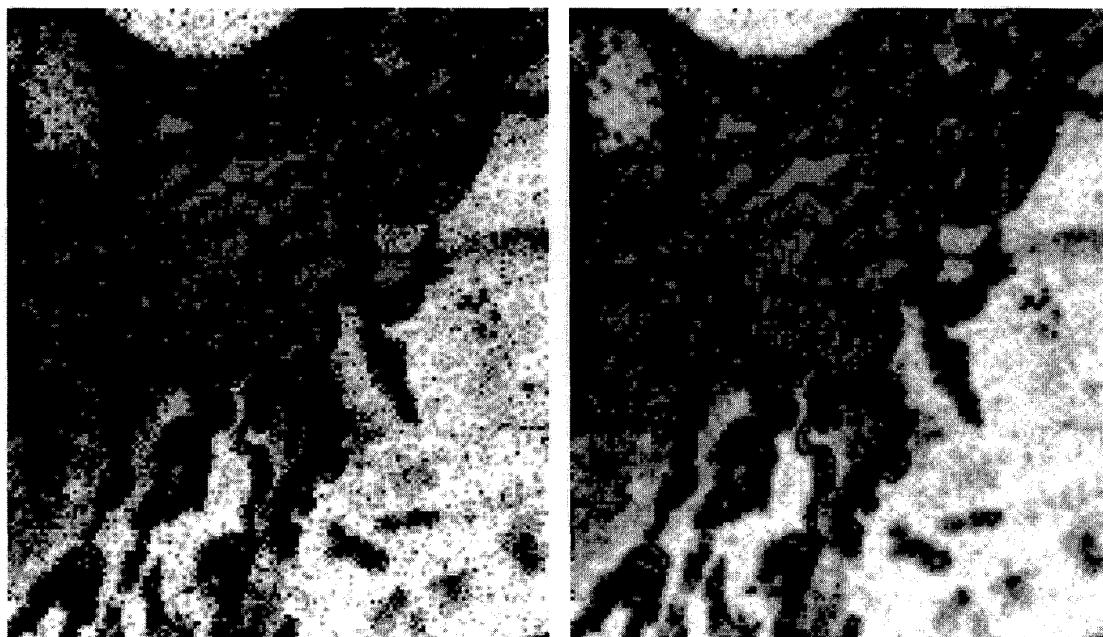


図4 NIH ImageによるSummed Image像  
レーザー照射後0～10分まで0.5分間隔で取得された16枚のSummed Image像  
左；Smoothing処理なし，右；Smoothing処理あり

表3 解析結果 ProtrusionとRetraction

#	Area	Smoothing(-)		Smoothing(+)	
		Prot	Ret	Prot	Ret
1	1606.2	161.1	157.2	131.7	127.6
2	1606.2	140.8	164.5	111.5	141.5
3	1606.2	154.4	148.9	123.8	119.3
4	1606.2	126.8	146.1	89.0	113.1
5	1606.2	152.5	153.5	117.9	120.1
6	1606.2	135.6	149.2	102.2	118.8
7	1606.2	144.9	141.5	116.9	105.0
8	1606.2	140.4	137.7	111.5	114.6
9	1606.2	136.2	155.5	103.7	126.9
10	1606.2	133.4	131.0	99.3	96.6
11	1606.2	134.0	141.7	102.5	111.3
12	1606.2	136.3	145.1	98.5	109.9
13	1606.2	135.7	142.3	102.5	106.6
14	1606.2	129.0	140.5	94.5	113.9
15	1606.2	127.9	136.4	97.8	104.5

unit:  $\mu\text{m}^2$

レーザー照射後0～10分まで0.5分間隔で取得された16枚の画像におけるProtrusionとRetractionの面積

Prot ; Protrusion, Ret ; Retraction

28.6  $\mu\text{m}^2$ であった。Retractionの面積は、濃い条件「HIGH」では205.4  $\mu\text{m}^2$ ，中間「OPT」では91.3  $\mu\text{m}^2$ ，薄い条件「LOW」では30.3  $\mu\text{m}^2$ であり，smoothing処理した場合は，それぞれの値が「HIGH」132.4  $\mu\text{m}^2$ ，「OPT」85.6  $\mu\text{m}^2$ ，「LOW」35.0  $\mu\text{m}^2$ であった。

#### 4. 解析結果（その2）

経時的に取得された16枚の画像をスタック化した後，Make Montageマクロを使用して作成した画像においては，ミトコンドリアの移動する様子が観察できた（図3）。

Center PointおよびSummed Imageマクロを用いてアウトライン化し，16枚の像を重ね合わせた画像においては，変動した領域が黒い輪郭で太く幾重にも示されており，個々の形態はやや不明瞭となっていた（図4，左）。

Smoothing処理を施した場合は，不要なノイズが除去されて画質が改善されたが，微細な凹凸は逆に不鮮明となった（図4，右）。

連続した16枚の画像間におけるProtrusion（増加した領域）とRetraction（減少した領域）の面積を，smoothing処理したもの（+）と，処理しないもの（-）別に測定した結果を表3に示した。

Smoothing処理を施すと，すべての値に減少する傾向が認められた。

#### 考 察

NIH Imageには様々な目的に応じたマクロが開発・配布されており，今回使用したものもその一部である。一連の共焦点レーザー顕微鏡像を一括処理し，ミトコンドリアの動態を視覚的にとら

え、なおかつ変化した面積を計測する目的で、ProtrusionおよびRetractionマクロを選択・使用した。

Protrusionマクロ構文（図1）の{Step 4}において、面積の計測がなされているが、これは以下の式で算出されている。

$$\{(\text{全面積}) \times (\text{平均濃度})\} \div \text{黒い点の濃度値 (255)} = \text{黒い点の数}$$

値は通常「pixel」で表示されるが、今回はSet Scaleで「 $\mu\text{m}$ 」に較正してあるため、単位は「 $\mu\text{m}^2$ 」となっている。

2枚の画像を計測した結果（表2）では、いずれの値も濃度が濃い条件「HIGH」が最も高く、中間「OPT」、薄い条件「LOW」の順に低くなっていた。この現象は、濃度の濃い方がいわゆる肉乗りとなって粒子の大きさが増すことによるものと考えられる。

一方、smoothing処理した場合は、それぞれの値が不規則に増減し、一定の比率で変化はしていなかった。これは、smoothing処理によって霜降りのようなノイズが除去されるだけでなく、ピクセルの細かな凹凸領域が平坦化されたために、選択領域の面積が不規則に増減したことによるものと推定される。

そこで、最適なLUTおよびDensity Sliceを決定するためには、対象物の平均濃度を個別に計測しておいて、その値に合わせて条件を決定することが望ましいと考えられる。また、対象物ができるだけ適切に選択できるように抽出範囲を合わせることも重要であると思われるが、視覚のみに頼らず、実際に数値を計測することが、実験の再現性を保つ上で必要不可欠な要素と考える。

画像解析した結果を詳細に検討すると、動きが小さいと考えていた細胞やミトコンドリアが短時間の間に大きく変動することが明らかとなった<sup>3)</sup>。しかしながら、像が変動する原因には、細胞自体の他に機械的な要因も考えられる。すなわち、顕微鏡のステージの高さが変動する場合、あるいは油浸レンズ用のオイルが乾燥して焦点が変化する場合なども要因として考慮しなければならない。今回使用した共焦点レーザー顕微鏡は、 $0.2 \mu\text{m}$

程度のステップで光学的断層像を取得する能力があるため、少しでも焦点が変われば、像も変化することとなる。そのため、同一視野の、同一焦点において一連の画像を取得したとしても、像が変化する要因には十分な配慮をしなければ正確な解析はできないと思われる。

以上の結果、NIH Imageで画像を解析する場合の重要な点は、事前にLUTおよびDensity Sliceで適当な値（lower, upper）が決定されていないと良い結果が期待できないことであり、さらに、対象物を適切に識別・抽出するためには、境界部に十分な濃度差が必要なことである。この点において、共焦点レーザー顕微鏡の画像は比較的是っきりとした濃度差を有しており、画像解析には適した特性をもつといえるであろう。

今回、対象物が小さなミトコンドリアの動態解析を試みたが、元画像の大きさ（pixel）が対象物と比較して十分な大きさがなかったことにより、ミトコンドリア領域の抽出にやや難があったと思われる。対象領域が小さな場合は、画像を取得する際、可能な限り高い拡大率で撮影して対象領域の解像度を高く保つことと、対象領域の濃度差を十分表現できるコントラストをもった画像を取得することが重要な要件であると考えられる。

おわりに、画像解析に使用したNIH Imageは、Scion Imageと同様、解析できる画像が8 bitに制限されている点が最大の短所であり、32bitフルカラー画像を解析処理できるソフトウェアの登場が望まれていたが、近年、16bitおよび32bitの画像を取り扱うことが可能で、多くのプラットフォーム上で動作するJavaベースのImageJという改良版がNIHで開発され、現在は無料で配布されている。このソフトウェアもマクロ処理が可能で、様々な追加機能をプラグインという形で入手できるため、今後は利用が増えるものと思われる。

## 結 論

レーザー照射による細胞内小器官の動態を解明する目的で、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に得られたミトコンドリアの蛍光画像を、NIH Imageのマクロを用いて解析を試み、その条件と問題点を検討した結果、以下の結論を得た。

1. NIH Imageのマクロは、共焦点レーザー顕微鏡の蛍光画像を一括処理し、解析を施すために大変有効な機能である。

2. ミトコンドリアを適切に抽出するためには、あらかじめミトコンドリアの平均濃度を測定し、LUTおよびDensity Sliceにより抽出範囲を適切に調整する必要がある。

3. ミトコンドリアのような小さな対象物を抽出するためには、共焦点レーザー顕微鏡で可能な限り大きな画像を取得する必要がある。

4. Smoothing処理は、不要なノイズを除去するためには有効であるが、微細な凹凸が平滑化されるための弊害も認められる。

## 文 献

- 1) 小島清嗣, 岡本洋一編: まるごと実践! 画像解析テキスト NIH Image新講座. 初版第1刷; 1-

181 羊土社 東京 1997.

- 2) 高木茂樹: 骨系細胞に対するソフトレーザーの効果. 奥羽大歯学誌 **22**; 280-287 1995.
- 3) 土肥宏樹, 齋藤 勇, 西上堅二, 月田秀夫ほか: 培養歯肉上皮細胞の細胞運動におよぼす低出力レーザーの影響. 奥羽大歯学誌 **30**; 141-147 2003.

<関連WEBサイト> (平成19年3月6日現在)

NIH Image Home Page

<<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>>

ImageJ Download Site

<<http://rsb.info.nih.gov/ij/download/>>

Scion Corporation Home Page

<<http://www.scioncorp.com/>>

著者への連絡先: 齋藤 勇 (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座  
Reprint requests: Isamu SAITO, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan