

## OS2-4

## 多点照明法を用いた培養細胞観察システムの開発に関する研究

## Study on development of cell culture observation system using multi-point lighting

○野口展士 (電機大)、幡多徳彦 (電機大フ)、野中一洋 (電機大)

福井康裕 (電機大)、舟久保昭夫 (電機大)

Hiroo NOGUCHI, Kazuhiro NONAKA, Yasuhiro FUKUI, Akio FUNAKUBO, Tokyo Denki University  
Norihiko HATA, Frontier Research and Development Center, Tokyo Denki University

**Abstract:** In regenerative medicine, it is necessary to develop the method of process management and quality evaluation for the cell tissue produced in autologous cell culture. The observation system has been used Phase-contrast image for noninvasively and quantitatively evaluation of cell tissue. However, it is difficult to process the image of the cell tissue with a thickness and color. The purpose of this study is development of the bright-field observation system with multi-point lighting method. Cells were captured using the observation system constructed with four white LED and CCD camera. The cell image was synthesized using four capturing cell images. As result of image processing, the contours of cultured cells could be enhanced at the synthesis image. In conclusion, the cell that was difficult to detect with one direction lighting was possible to observe a clear cell image.

**Key Words:** multi-point lighting, image processing, observation system, bright-field

## 1. 諸言

再生医療で行われている自家細胞培養による細胞組織の生産では、培養プロセスにおける管理方法・細胞品質に対する評価技術が必要である。患者から細胞を採取し、培養された細胞組織の評価において、生産原理および原料の希少性から細胞の消費を避ける必要がある<sup>1)</sup>。そのため細胞培養プロセスの経時的な観察と非侵襲計測における細胞挙動の定量化手法、そして管理、品質評価システムの組織形成予測システム構築が必要である<sup>1)</sup>。これまで細胞組織の観察において位相差画像による観察システムが用いられてきたが、細胞組織に厚みや色がある場合には鮮明な細胞画像が得られず、画像処理による非侵襲評価が困難であった。

本研究では、明視野観察において多点照明法による新たな観察システムの開発を目的とした。今回は基礎検討として、細胞培養プロセスにおける多点照明法を用いたシステムの検討および画像処理手法について検討を行ったので報告する。

## 2. 多点照明法を用いた明視野観察システム概要

多点照明法を用いた観察システムは、明視野観察システム (CCM-1.4XYZ/CO<sub>2</sub>, アステック社) に新たに複数の白色 LED を付設し、各照明の点灯時における顕微鏡画像を取得するものである。本研究では白色 LED を 4 つ用い、CCD カメラを軸に同心円状に設け、被写体である細胞培養器に対して垂直に固定した。そして白色 LED を順に点灯させ、各方向における細胞画像を取得するシステムを構築した。取得した画像を合成し新たに細胞画像を作成した。

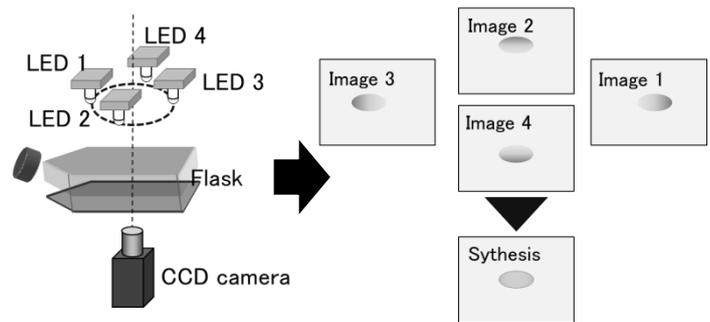


Fig. 1 Schematic diagram of the observation system with multi-point lighting method

## 3. 画像合成方法

合成された細胞画像は、鮮明に細胞の識別が可能である必要がある。そこで細胞観察において得られた画像について、鮮明な観察が可能な画像合成手法について検討を行った。画像合成方法は、取得した画像上における座標において、(1)式を用い平均画素値を求める方法 (単純合成法)、(2)式を用い画素値の合算値と閾値の差分値を求める方法 (加算合成法)、(3)式を用いて輝度の偏りを算出し偏った度合 (偏り度) を利用する方法を用いた。

$$P_{(w,h)} = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n |O_{i(w,h)}| \quad \dots (1)$$

$$P_{(w,h)} = \sum_{i=0}^n |O_{i(w,h)} - th| \quad \dots (2)$$

$$P_{(w,h)} = \sum_{i=0}^n |O_{i(w,h)} - ave| \quad \dots (3)$$

ここで、 $P$  は合成後の画素値、 $O_i$  は取得画像の画素値 ( $w, h$ ) は画像上の座標、 $th$  は閾値、 $ave$  は同座標における画素値の平均値である。

#### 4. 画像処理

画像処理方法について検討するため、増殖期にある低密度の細胞画像および細胞の識別が困難になるコンフルエントに近い状態の細胞密度の細胞画像を用い、画像処理を行った。そして、最適な画像処理方法を検討した。

一方向から白色 LED を点灯させた場合の細胞画像および低密度の細胞画像の合成処理結果、高密度の細胞画像の合成処理結果を Fig.2, Fig.3 に示す。平均値を用いた単純合成法は Fig.2(b)より、隣接した細胞を識別しにくいことが確認された。これは合成する画像の画素の平均値をとるため、平滑化され変化が小さくなることが考えられた。画素値の合算と閾値との差分を用いた加算合成法は Fig.2(c)より、細胞が元画像より細胞が強調されることが確認された。単純合成法とは異なり、画素値の合算をとることで細胞および背景、隣接する細胞の画素値の変化が大きくなると考えられた。偏り度を用いた合成方法では Fig.2(d)より、画像内の細胞の輪郭が強調されることを確認した。

高密度の細胞画像では、Fig3(b)より単純合成法を用いた場合低密度の細胞画像と同様に細胞が鮮明ではない結果が得られた。しかし、加算合成法および偏り度を用いた合成法では、Fig.3(c) Fig.3(d)より高密度の細胞画像においても強調されることが確認された。この結果から、1方向からの照明による観察では検出が困難な培養細胞に対しても、より鮮明な細胞画像を得ることが可能となった。一方で隣接する細胞同士の識別が困難になる部分の確認された。高密度における細胞画像では画素値の変化が低密度に比べて小さいことが考えられ、強調されにくいことが考えられた。そのため細胞画像を鮮明にするためには、画像合成に加え、さらに処理手法の検討が必要と考えられる。

#### 5. 結言

本研究では、明視野観察において多点照明法による新たな観察システムの開発を目的として、多点照明法を用いたシステムの検討および画像処理について検討を行った。合成された画像は培養細胞の輪郭がより強調されることで検出が容易になり、1方向からの照明による観察では検出が困難な培養細胞に対しても、より鮮明な細胞画像を得ることが可能となった。

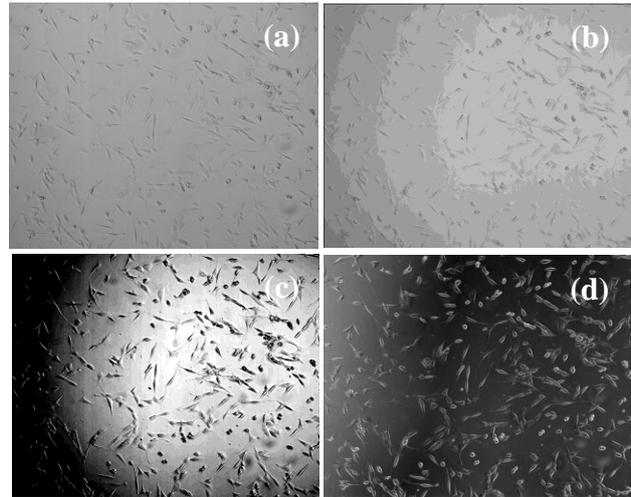


Fig. 2 Cell Images of low cell concentration processed using each synthesis method, (a) original image, (b) simple synthesis, (c) additive synthesis, (d) The degree of deviation

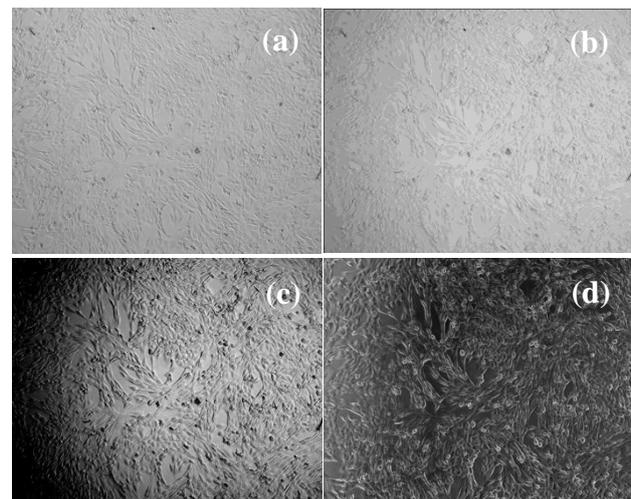


Fig. 3 Cell Images of High cell concentration processed using each synthesis method, (a) original image, (b) simple synthesis, (c) additive synthesis, (d) The degree of deviation

#### 参考文献

- 1) 紀ノ岡正博, 田谷正仁:組織培養における細胞評価”, 最近の化学工学 56—先端医療における化学工学(化学工学会関東支部編),pp.79-97, 化学工業社, 東京, 2004.
- 2) 野中一洋,野口展士,矢口俊之,幡多徳彦,福井康裕,舟久保昭夫: 粒子画像流速測定法を用いた培養面における細胞集団の挙動解析,ライフサポート,2010;22(3): 39-4