

(12) 画像解析を導入した染色体異常試験法の開発

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR CHROMOSOMAL ABERRATION TEST USING IMAGE ANALYSIS

住友 恒*・伊藤禎彦*

Hisashi SUMITOMO*, Sadahiko ITO*

ABSTRACT: Image analysis was inducted to chromosomal aberration test carried out on Chinese hamster lung cell (CHL), for the purpose of getting objective results. First, chromosomes which had been judged to be normals or aberrations by experts, pictures of which are edited and published by The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS), were analyzed. 802 chromosomes including 83 aberrations were distinguished by an algorithm which was developed with fundamental shape parameters. Consequently, 91.1% of exchanged-type aberrations, 47.4% of broken-type aberrations, and 97.9% of normals were correctly distinguished. And it was concluded that this algorithm could be put into practical detections of exchanged-type aberrations. Subsequently, practical specimens of CHL chromosomes which had been exposed to MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and formaldehyde were analyzed by the same algorithm. It was confirmed that chromosomes detected as exchanged-type aberration were increased with concentration of added substances.

KEYWORDS: image analysis, chromosomal aberration test, Chinese hamster lung

1. はじめに

自然水中や飲料水中に含まれる変異原物質や発癌物質を検出するためには、Ames法に代表される微生物を用いたスクリーニングテストが行われることが多い。しかしヒトに対する危険性を定量的に評価するためには、哺乳動物を試験対象とすることがより望ましく、そのための簡単な試験法として哺乳動物の培養細胞を用いる方法がある。一方、遺伝学的指標の点からは、遺伝子の突然変異だけではなく、染色体異常を指標とする試験も必要であるというのが、変異原性試験法における日本を含めた国際的動向といえる⁽¹⁾。したがって安全性を論じていく上で、哺乳動物の培養細胞を用いた染色体異常試験をとり入れていく意義は大きい。

細胞材料としては、一般に、1)染色体数が25本と少ない上、染色体が大きいので異常の観察に適していること、2)増殖が速く実験が短期に行えること、3)薬物に対する感受性が高いこと⁽²⁾を理由にチャイニーズ・ハムスター肺細胞 (CHL) が好んで用いられており、本研究ではこれを使用した。また、染色体異常試験を遂行するに際しては、検鏡により異常を判定していく必要があるが、その判定基準、記録の方法などが統一的であるとはいえず、研究者によって報告結果に差があることが考えられる。さらに染色体の分析には相当の時間と熟練を要する。この点に鑑み、本研究は、染色体像を画像解析することによって異常を検出し、試験結果に客観性をもたせることを目的としている。

一方、画像処理技術 (ハード) 自体は高度に発達してきている⁽³⁾ものの、それを使いこなすための解

* 京都大学工学部衛生工学科 (Department of Environmental and Sanitary Engineering, Kyoto Univ.)

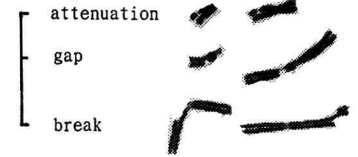
析手法（ソフト）は整備されているとはいえない。すなわち、画像処理技術を導入しようとすれば個々の課題ごとに地道に解析手法を構築していくことが現在極めて重要で、本研究はその例を示しうものとも考えている。

2. 染色体構造異常の種類と「化学物質による染色体異常アトラス」について

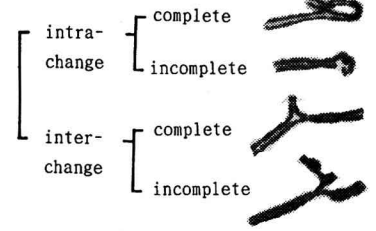
2-1 染色体構造異常の種類

化学物質を与えたときに生成する染色体異常は、切断型と交換型に大別することができる。さらにそれぞれを細分し、その典型例を示したものが図1である。図中、attenuation（やせ細り）は、構造異常には含まないのが普通であるが、画像解析では切断型と同等に扱える場合が少なくないことから、本解析では切断型の一 種として扱った。また、染色体内交換とは1本の染色体に生成した異常であり、染色体間交換とは2本以上の染色体から異常が生成するものである。

1. broken-type



2. exchanged-type

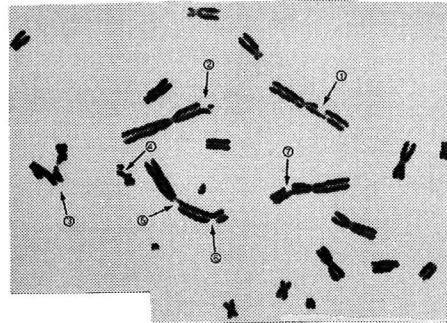


2-2 「化学物質による染色体異常アトラス」について

「化学物質による染色体異常アトラス」⁽¹⁾は、多くの専門家が提供した染色体異常の写真資料に対し、異常箇所の指摘とその分

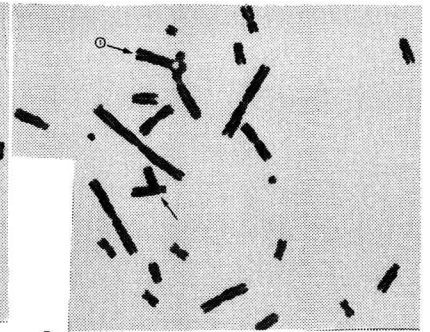
類を図1よりさらに詳細に行ったものである。例を図2、図3に示す。この資料に示された写真の多くはチャイニーズ・ハムスター株細胞についてのものである。以下、この写真資料中の染色体を異常アトラス染色体と称して、4章に

Fig.1 Typical examples of chromosomal aberrations



①②④⑥break, ⑤⑦gap.
③incomplete interchange

Fig.2 Example of chromosomes in the "Aberration Atlas"



①complete interchange, arrow without number points to overlapping chromosomes

Fig.3 Example of chromosomes in the "Aberration Atlas"

述べる実際標本と区別することにする。

本資料は日本環境変異原学会が染色体異常の標準的判定方法を集大成したものである。本資料を直接画像解析に供し、これに対する識別方法を呈示することができれば、同じ識別方法を適用することにより、実際標本の異常染色体の定量化が可能になる。この方針によれば、自ら作製した染色体標本を解析対象としないため、染色体異常の判定に関して熟練する必要がない点が重要であって、開発する識別方法は高い客観性を有することになる。

3. 異常アトラス染色体の画像解析

3-1 画像処理の概要

画像処理装置概要を図4に示す。システムとしては顕微鏡画像を入力する方式になっているが、異常アトラス像の入力にあたっては別途マクロ撮影装置を用いた。図形の定量化のためには、入力信号に対

し、あるレベル(しきい値)より信号が大きいき、小さいとき0とする2値化を行う。

その後、重なり染色体や異物の除去、接触部分の切り離し、同時に2値化された矢印の除去等をディスプレイ上でマニュアル操作により行う。

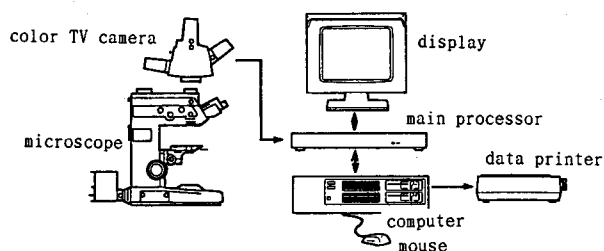
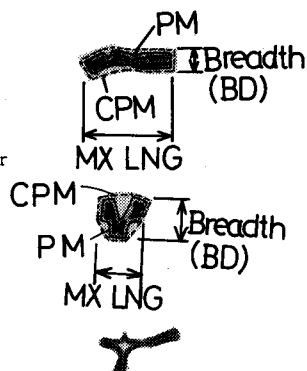


Fig. 4 Microscope-image processing system
microscope:Nikon MICROPHOT-FX
processor:Nikon LUZEX2D



PM:perimeter
CPM:convex perimeter
MX LNG(ML):maximum length

Fig. 5 Definitions of parameters

3-2 解析対象染色体の選択

本アトラスには多くの専門家が写真を提供しているため、染色体標本のでき方が微妙に異なっている。主要な相違点是一对の染色体の開き具合である。その結果全ての染色体を解析対象とすると、正常染色体自体の形状に違いがあるため、識別上困難が伴うことがわかつ

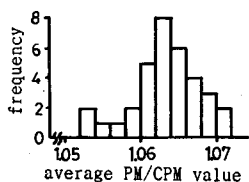


Fig. 6 Distribution of average PM/CPM values of normal chromosomes 1 prepared

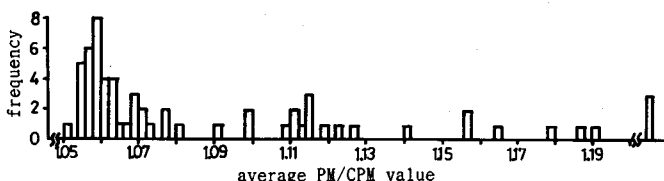


Fig. 7 Distribution of average PM/CPM values of normal chromosomes in the "Aberration Atlas"

た。そこで、後に異常の識別を行うべき自製の染色体標本を基準として、正常染色体の形状が同じと考えられる写真を選択することにした。ちなみに筆者の作製している染色体標本は基本的に染色体の開きは小さいか殆ど見られないものである。選択にあつたパラメータとしては、開き具合を鋭敏に測ることができるPM/CPM(PM:周囲長, CPM:包絡周囲長, 図5参照)とした。PM/CPMは図形の凹凸を表す形状係数で、周囲形状が複雑なものほど大きな値となるものである。

正常染色体標本は継代後2日目に作製した。その他は4章に述べる方法に準じている。1本の培養瓶から1標本を作製し、計34標本を作製した。各標本から任意の1染色体像(染色体数25本の)PM/CPM値を計測し、その平均値(45°以上の曲り染色体を除く)のヒス

Table 1 Classification of aberrations of chromosomes in the "Aberration Atlas" which are analyzed

No.	正常染色体数(曲り含む)	異常な染色体数(45°以上曲り含む)	切断型	染色体内交換	染色体間交換	他	総数
1	20	1	2	1	1		23
2	17		1(1)	1	1		24
3	20		1	1	1		24
4	21		2	1	1		22
5	21	2		1	1		22
6	20	1		1	1		22
7	23	1		1	1		25
8	15			3		1	20
9	23			1			23
10	20	3		2			24
11	22	2		1			22
12	20	1		1			21
13	22				1		23
14	19	1			1		20
15	22				1		23
16	24					1	25
17	19	1				1	20
18	14			1	4(1)		20
19	21	1				1	20
20	22	1			1		22
21	14			1			24
22	15	4		1	2	1	17
23	23		1	1	1		17
24	18			1		1	26
25	20			1			20
26	14			1			22
27	18	1			1	1	16
28	21	1			2		21
29	20			1			22
30	16	3					21
31	21	2	1(1)		1	3	23
32	28	1				1	30
33	47	1			1		48
34	18		6(1)				24
35	21	1	3				24
合計	719	29	15(3)	8	15(2)	14	802
			38(5)			45	

()は曲りを含むもの

トグラムを示したものが図6である。危険率5%, χ^2 検定によって正規分布性を確認し、95%存在域を求めると 1.0542 < PM/CPM平均値 < 1.0722 となる。同様に異常アトラス染色体中の正常染色体(45°以上の曲り染色体も除く)のPM/CPM平均値のヒストグラムを図7に示す。図6と比較して値の大きなものが存在していることがわかるが、この違いは染色体の開き具合に由来するものである。PM/CPM平均値が上の範囲にある異常アトラス染色体は、62標本中、35標本であった。この35標本について異常の種類と数をまとめて示したものが表1である。

3-3 異常識別方法と結果

(A) 異常形状の考察

形状解析にあたり、各異常形状の簡単な考察を行う。(図5参照)

切断型においては、染色体の一部が欠落しているだけなので、染色体の大略的形状に変化はない。また欠落した部分だけ周囲長が増大し、形状が複雑になる。パラメータ上では幅/長さ比(BD/ML, こに B D:幅, MLおよびMX LNG:絶対最大長)は不変で、PM/CPM値のわずかな増大が認められる。一方、交換型では、形状が大きく変化し複雑になっているものが多い。また図のように、構造によっては2値化したとき穴が検出されるものがある。パラメータ上ではBD/ML, PM/CPMともに増大が認められる。穴がある場合は染色体画像内の穴の面積が正となる。

以上の考察により、最初にパラメータPM/CPMによって切断型、交換型異常をもつ染色体と正常染色体とを識別することを試みる。

(B) PM/CPMによる識別

図8は、表1の35標本、計802本の染色体について、PM/CPM値を画像面積Areaに対してプロットしたものであり、Areaの単位は画素数 [pt] である。

識別曲線は、異常の見落とし率が小さくかつ正常の見誤り率が小さくなるように設定した。その結果交換型、切断型異常の見落とし率はそれぞれ 4.5%, 36.1%、正常の見誤り率は1.88%となっている。識別曲線を図の位置より全体的に上昇させた場合、正常の見誤り率が低下しないわりに異常の見落とし率が増大し、逆に下降させると異常の見落とし率が低下しないわりに正常の見誤り率が増大する。

図8にみられる特徴を列挙するとつぎのようである。

- ① 交換型の殆どは抽出可能である。(95.5%)
- ② 切断型の抽出率は63.9%である。
- ③ 図9に示すように、パラメータPM/CPMの性質により、曲り染色体も抽出されている。曲り角度が大きくなるほどPM/CPM値も大きくなる。識別曲線付近の曲り角度は約45°であり、今後曲り染色体という場合、この識別曲線で抽出される曲り角度45°以上の染色体をさす。

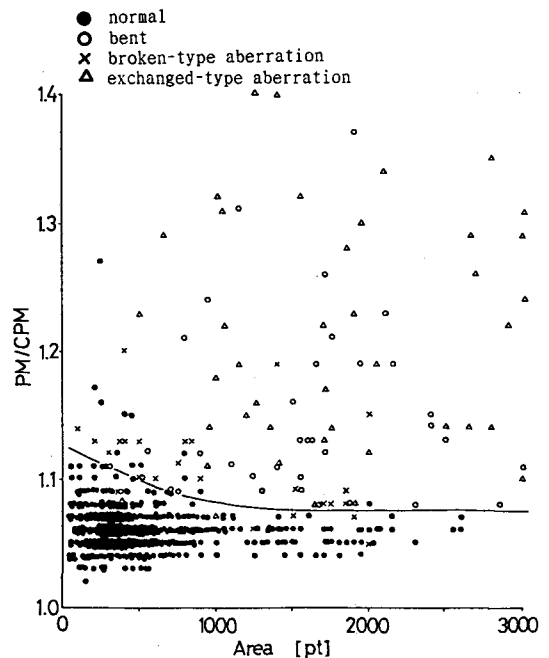


Fig. 8 Distribution of all chromosomes in the "Aberration Atlas" (n=802)

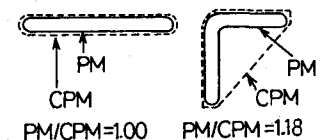


Fig. 9 Bent chromosome and its PM/CPM value

- ④ 識別曲線より上方の領域から曲り染色体を除去できれば、全体としてかなり良好な識別になるものと推察される。

(C) 切断型の識別

(A)の考察により、図8で抽出された染色体のうち、BD/ML値が正常域に存在するものを切断型とする。図10は、切断型異常染色体のうち図8で抽出されたものをBD/ML～MX LNG 平面上にプロットしたものである。なお識別曲線は図8と同様に正常染色体をプロットすることにより求めたものである。図10により、

- ① PM/CPM値が増大した染色体も大略的形状に変化はないため、大部分(78.3%)は正常域(下側)に分布している。
- ② 曲りを伴う切断型異常染色体に対してはその異常を検出することができない。それらはこの時点では曲りまたは交換型異常と判定される可能性がある。

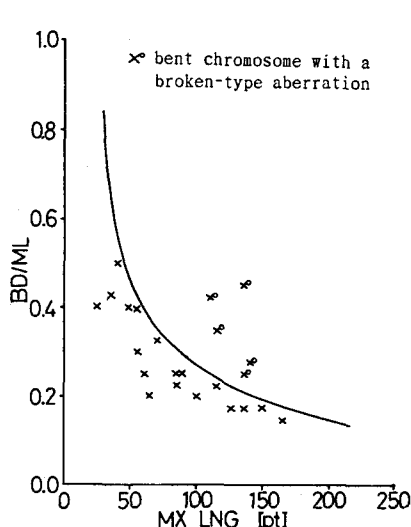


Fig. 10 Distribution of chromosomes with a broken-type aberration

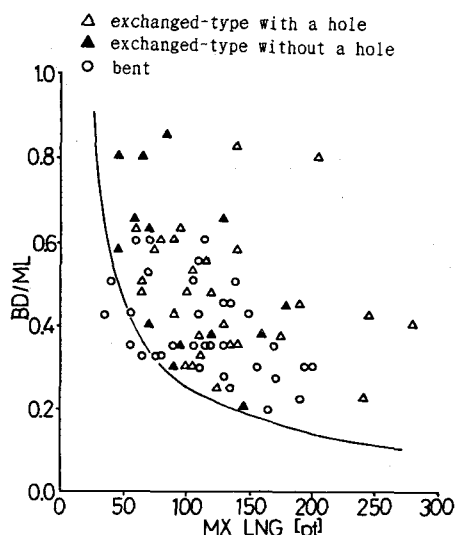


Fig. 11 Distribution of chromosomes with an exchanged-type aberration and bent chromosomes

(D) 交換型と曲りの識別

図8で抽出された染色体のうち、BD/ML値が正常域にないものを交換型または曲り染色体とする。

図11は、交換型異常染色体のうち図8で抽出されたものおよび曲り染色体をプロットしたものである。交換型の100%、曲り染色体の86.2%が正常染色体から識別されている。

交換型と曲りの識別という点では、この段階で染色体内に穴をもつものを交換型として抽出することが可能である。

(E) 曲り染色体の除去

一般に、BD/ML値を与えればそこに入るべき曲り染色体形状は決定され、PM/CPM値も決定されるものと推察される(図12参照)。幾何学的にはこれには大きさの条件が必要であるが、実際上は比較的小さな曲り染色体は図8および図11で正常染色体域に存在することが多いため、ここで除去すべき染色体は、25本のうち大きいほうから数えて7番目までの染色体である場合が殆どである。したがってここでは大きさの条件はとりあえずはずして考える。

以上のことから曲り染色体においては、BD/ML値とPM/CPM値は1対1対応に近いことが期待される。実際、図11で抽出された曲り染色体を、BD/MLを横軸、PM/CPMを縦軸にしてプロットすると図13のように極

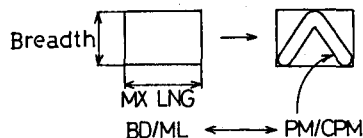


Fig. 12 Relation of BD/ML value and PM/CPM value of bent chromosome

めて狭い帯域に存在することがわかった。そしてこの対応関係からはずれた染色体は曲りとは異なるなんらかの構造をもつものと推察される。

図11で抽出された交換型異常染色体をプロットしたものが図14である。ここでは参考のために穴をもった染色体をも同時に示した。結果として、76.2%が曲り染色体域の外に存在した。

さらに曲り染色体域の外側に存在する交換型染色体形状について言及しておく。図14で領域A(曲り染色体域の上側)に存在するものは、あるBD/ML値をもつ曲り染色体よりもそのPM/CPM値が大きい。すなわち外形がかなり複雑なものである。領域B(曲り染色体域の下側)に存在するものは、あるBD/ML値をもつ曲り染色体よりもそのPM/CPM値が小さい、すなわち周囲長と包絡周囲長が比較的近い値であることを示す。曲り染色体がそのような構造を示すことはない。図15にこれらの例を示す。

(F) 識別結果のまとめ

以上述べた染色体異常の識別方法をまとめて示すと図16のようになる。

表1に示した全染色体の識別結果を表2に示す。表は例えば、解析対象とした染色体のうち曲りを除く正常なものは全部で690本あったが、画像解析の結果このうち正しく正常と識別できたものは679本、誤って切断型異常、交換型異常と識別されたものはそれぞれ9本、2本であり、その識別率は98.4%であることを示している。

切断型全体の識別率は47.4%と低いが、交換型全体では91.1%と高い識別率が得られ、交換型異常の検出については実用にたえうるものと判断される。

ところで発癌物質の多くのものは交換型異常を多く出現させる傾向にあるとされ、石館⁽²⁾⁽⁴⁾は検体の一定濃度[mg/l]あたりの交換型異常をもつ細胞の出現頻度(TR値と称している)を試験結果の定量的比較方法のひとつとして考案している。したがって、本識別法によって交換型異常のみを検出していくのも不適切ではないと考える。

つぎに、異常染色体のうち誤識別されたものの例を表3に、また正常染色体のうち誤って異常と識別されたものは15本あったがその例を表4に示す。

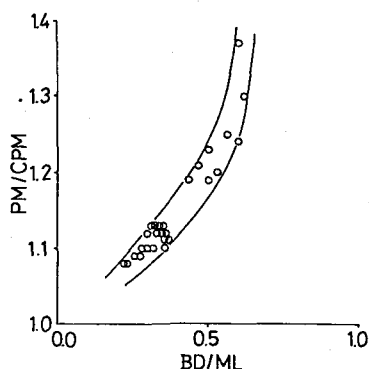


Fig. 13 Distribution of bent chromosomes

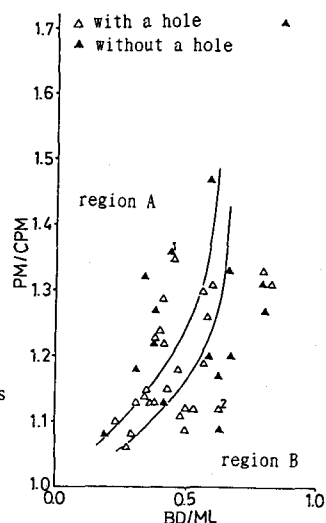


Fig. 14 Distribution of chromosomes with an exchanged-type aberration

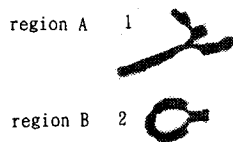


Fig. 15 Chromosomes with an exchanged-type aberration which are located outside the region of bent chromosomes (numbers correspond to ones in Fig. 14)

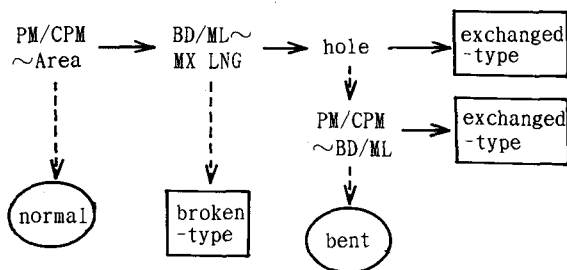


Fig. 16 Method of distinction of chromosomal aberrations using image analysis

→ detected case
--> undetected case

Table 2 Result of distinguishment of chromosomes in the "Aberration Atlas"

			* C or I	result of image analysis			total	percentage of correct distinguishment		
				normal	aberration					
					broken -type	exchanged -type				
chromosome structure	normal	unbent	C I	679 —	— 9	— 2	679 11	98.4%	97.9%	
		bent	C I	25 —	— 4	— 0	25 4	84.0%		
	broken -type aberration	attenuation	C I	— 9	6 —	— 0	6 9	40.0%	47.4%	
		gap	C I	— 3	5 —	— 0	5 3	62.5%		
		break	C I	— 5	7 —	— 1	7 6	53.8%		
		acentric fragment	C I	— 2	0 —	— 0	0 2	0.0%		
	exchanged -type aberration	intra- change	complete	C I	— 2	— 0	12 —	12 2	85.7%	91.1%
			in- complete	C I	— 0	— 0	1 —	1 0	100.0%	
		inter- change	complete	C I	— 1	— 0	13 —	13 1	92.3%	
			in- complete	C I	— 0	— 0	12 —	12 0	100.0%	
		unclearly exchanged	C I	— 0	— 0	3 —	3 0	100.0%		
		dicentric	C I	— 1	— 0	0 —	0 1	0.0%		

* correctness C, correctly distinguished; I, incorrectly distinguished

Table 3 Example of chromosomes distinguished incorrectly

1. broken-type	kind of aberration	result of distinguishment
	gap	normal
	break	bent
	break and gap	exchanged-type
2. exchanged-type	kind of aberration	result of distinguishment
	complete intrachange	normal
	complete intrachange	normal
	complete interchange	bent
		(only 3 chromosomes)
3. others	kind of aberration	result of distinguishment
	acentric fragment	normal
	acentric fragment	normal
	dicentric	normal
		(only 3 chromosomes)

Table 4 Example of normal chromosomes distinguished incorrectly

result of distinguishment

broken-type
broken-type
bent(normal)
exchanged-type



4. 実際標本の画像解析

4-1 実験方法

細胞株は新生チャイニーズ・ハムスター雌の肺細胞(細胞名CHL/1U, 大日本製薬)を使用した。本細胞は Eagle MEM 90% + ウシ胎児血清 10% の培養液を用い、37℃にて継代培養しておく。

継代後2日目のCHL培養液中に、代表的発癌物質の1つであるMNNG(N-メチル-N'-ニト

ロ-N-ニトロソグアニジン)およびホルムアルデヒドを添加し、24時間培養した。但しMNNG粉末はエタノールで溶解しており、その結果培養液は0.04%のエタノールを含んでいる。24時間後、0.2mg/1 となるようにコルセミドを加えてさらに2時間培養し、その後染色体標本を作製した⁽²⁾。

標本は1000倍で検鏡するとともに、図4に示すように顕微鏡画像を直接テレビカメラより入力し、異常アトラス染色体と同様に2値化、マニュアル処理を行った後各パラメータの測定値を得た。本実験では各濃度任意の50個の染色体像に対し画像解析を行った。

異常識別にあたっては、異常アトラス染色体と実際標本の染色体ではディスプレイ上の大きさ(画素数)に違いがあるため図8、図10、11の曲線をそのまま適用するには無理がある。表1の異常アトラス染色体35標本の正常染色体と、図6の自製正常染色体のディスプレイ上での大きさ(画素数)を比較したところ、実際標本は異常アトラス染色体に対してAreaが0.53, MX LNGが0.67であった。そこで実際標本の異常識別に対しては、図8、図10、11の識別曲線を上記比率にしたがってそれぞれ左方ヘシフトしたものをを用いた。

4-2 実験結果

交換型異常を検出した結果を図17、図18に示す。MNNG、ホルムアルデヒドともに明らかな濃度依存性が認められる。

ところで両図は画像解析によって交換型と判断された数をそのままプロットしたものであり、誤識別されたものも当然含まれている。

そこで両図のひとつの見方として、その信頼度を表2の結果をもとに試算してみる。各濃度において本来検出されるべき真の交換型の数を p 、画像解析による検出数を q 、正常染色体数(曲り除く)を a 、曲り染色体数を b 、切断型異常数を c とすると、交換型識別率 $41/45(91.1\%)$ 、正常染色体の誤識別率 $2/690$ 、曲り染色体の誤識別率 $0/29$ 、切断型異常の誤識別率 $1/38$ であることから、つぎの等式がなりたつ。

$$\frac{41}{45} p + \frac{2}{690} a + \frac{0}{29} b + \frac{1}{38} c = q$$

c をパラメータとして $p/q \times 100 [\%]$ をプロットしたものが図19、図20である。図中、切断型の数は、50細胞中出现する切断型の数を仮定したもので、パラメータ c の値である。2つの図は、図17、図18において検出された交換型異常数から、異常アトラス染色体の識別信頼度に照らして、真の交換型の数を推定したものとなっている。図から、画像解析結果の信頼性は標本における交換型異常の出現頻度に依存する。その理由は、出現頻度が低い場合は正常染色体の誤識別の影響が大きくなるためである。例えば図19、図20

から百分率が80%となる濃度を読み取るとMNNGで0.6mg/l、ホルムアルデヒドで12mg/lであり、このとき交換型異常はそれぞれ12.5本/50細胞、11本/50細胞検出される。また真の交換型異常数はそれぞれ10本/50細胞、8.8本/50細胞と計算される。すなわち100細胞当たり20本程度の交換型

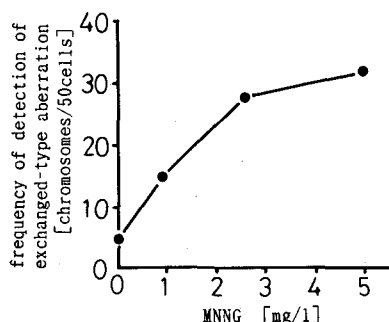


Fig. 17 Detection of chromosomes with an exchanged-type aberration(MNNG)

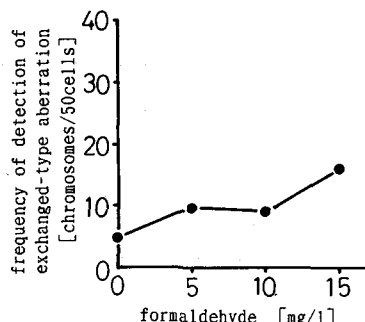


Fig. 18 Detection of chromosomes with an exchanged-type aberration (formaldehyde)

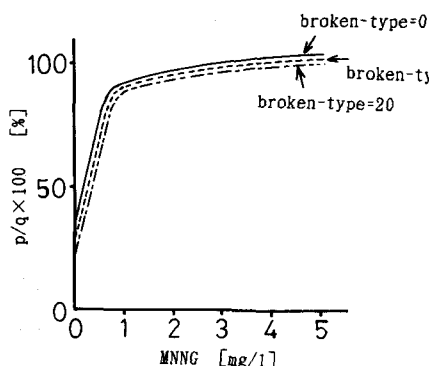


Fig. 19 Reliability of detection of exchanged-type aberration(MNNG)

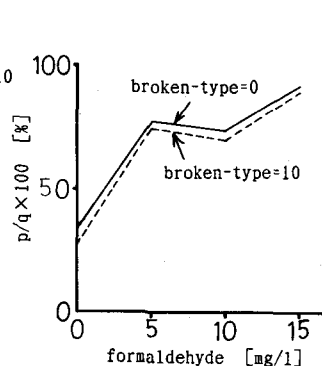


Fig. 20 Reliability of detection of exchanged-type aberration (formaldehyde)

異常が出現する標本であれば、画像解析結果は80%程度の信頼性を有することになる。

以上は、画像解析データの扱い方の一例を示したものであるが、今後、このような信頼性、精度、検出限界等、実際の染色体異常試験に適用していく上で問題となる点の検討が重要と考える。

5. おわりに

構造異常をおこした染色体集団の画像解析において、図形の凹凸を表す単一のパラメータによって、その染色体集団の形状が全体として複雑になっていく様子が検出できることはすでに示した⁽⁵⁾が、本研究はその染色体の1本1本に着目し、これを識別する方法を開発しようとしたものである。さらに本研究を通じての特徴は、検鏡に依存していない点である。すなわち、あらかじめ専門家が正常・異常の判断をした染色体異常アトラスを解析対象とし、その結果、開発した識別方法の信頼度を高い客観性を有しつつ定量化することができた。

特に交換型異常1本1本に対する識別では 91.1% という高い識別率がえられ、実際標本の画像解析に本識別方法を供しうるものと判断された。また実際標本の画像解析の結果、交換型異常検出数の濃度依存性が示される一方、その信頼度については標本における交換型異常の出現頻度に依存することも示された。

今後の課題点としては、①実際の染色体異常試験に適用していく上で問題となる信頼性、精度、検出限界等について検討すること、②および交換型異常の他の構造異常をも精度良く識別できる解析法を開発すること、と考えている。

【参 考 文 献】

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, 化学物質による染色体異常アトラス, 朝倉書店, 1988
- 2) 牧野佐二郎他編, 放射線・化学物質と染色体異常, 医学書院, 1982
- 3) 丸谷洋二他, 画像処理装置とその使い方, 日刊工業新聞社, 1989
- 4) 石館基監修, 染色体異常試験データ集, リアライズ社, 1983
- 5) 住友恒, 伊藤禎彦, 培養細胞(CHL)を用いた染色体異常試験による飲料水の安全性評価に関する基礎実験, 第40回全国水道研究発表会講演集, 529-531, 1989