

Segment.aiを使用した、ウサギ骨小腔の形態の自動抽出

硬い骨の中では、骨細胞どうしが神経細胞ネットワークのように細胞間ネットワークを構成している。北海道大学大学院歯学研究院薬理学教室の飯村忠浩先生、佐藤孝紀先生らは、このネットワーク構造を可視化して計測し、その機能的意義を研究されている。しかし、骨細胞は骨細胞突起（細胞体から出る無数の細胞突起）と連続した構造を持つため、従来の蛍光二値化法では、個々の細胞形態の抽出が困難であった。本アプリケーションノートは、顕微鏡AIモジュールNIS.aiの機能の一つである「Segment.ai」を利用することにより、骨小腔のセグメンテーションを自動化し、簡便に数を計測した例を紹介する。

研究の背景

骨には、骨を作る骨芽細胞、骨を壊す破骨細胞、そして骨のメカノセンサーとして機能する骨細胞がある。これらの細胞が協調することで骨の恒常性は維持されている。骨は絶えず形成と破壊を行い動的平衡を保っているが、このバランスが崩れると骨粗鬆症のような病気になる。骨細胞は、硬い骨の中にあって、非常に緻密な細胞間ネットワークを構成している(図1)。このネットワーク構造は非常に多彩で、骨への荷重の度合いや、骨の代謝回転(形成と破壊のターンオーバー速度)との関連が考えられるが、まだ不明な点も多い。

実験の概要

骨細胞の数や形態を計測することは、骨の代謝病態を探るうえで重要な指標となる。飯村先生らは、共焦点顕微鏡を使って、まず骨小腔(骨細胞を囲む骨の空洞)と骨細管(骨細胞突起を入れる骨の空洞)のネットワークが、自家蛍光によって可視化できることを明らかにした(図1、参考文献)。従来の二値化法では、連続した構造と輝度値をもつ骨小腔と骨細管を区別してセグメンテーションするには、手作業での修正を行う必要があった(図2b)。今回、取得した画像に「Segment.ai」を適用することにより、骨小腔の形態の自動抽出に成功した(図2c)。

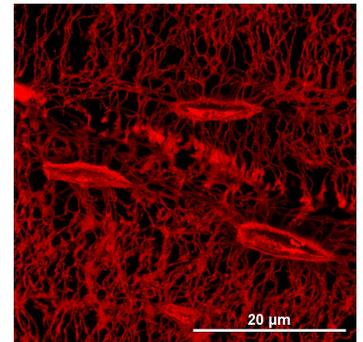


図1. 骨小腔と骨細管のネットワーク
 Villanueva染色したウサギ脛骨を自家蛍光撮像。100倍対物レンズを用いて、解像度0.04 μm/pixelで、Zスタック撮影した画像をEnhanced Resolution処理。Maximum intensity projection (MIP)で表示した。スケールバー：20 μm

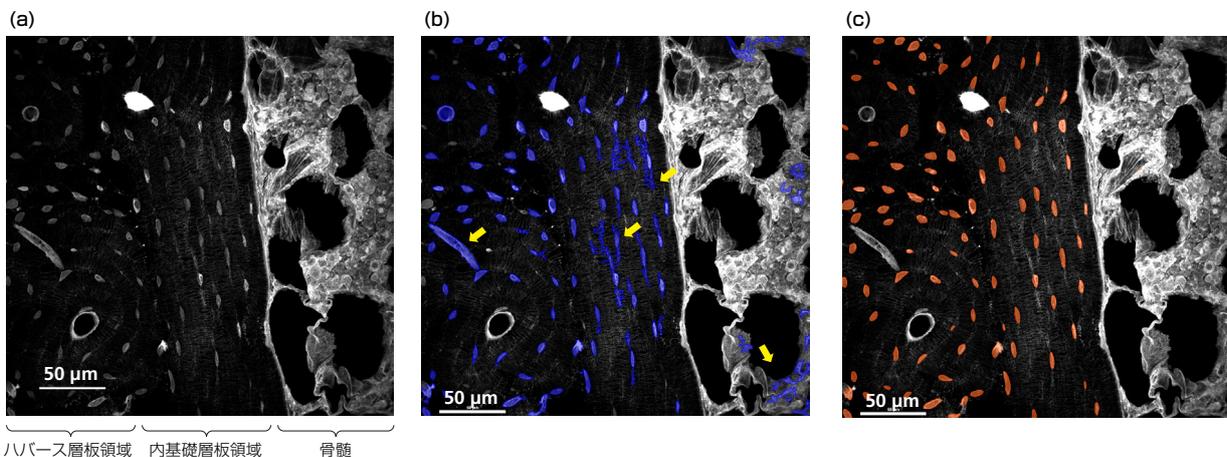


図2. 従来の二値化法とSegment.aiによる自動セグメンテーションの比較

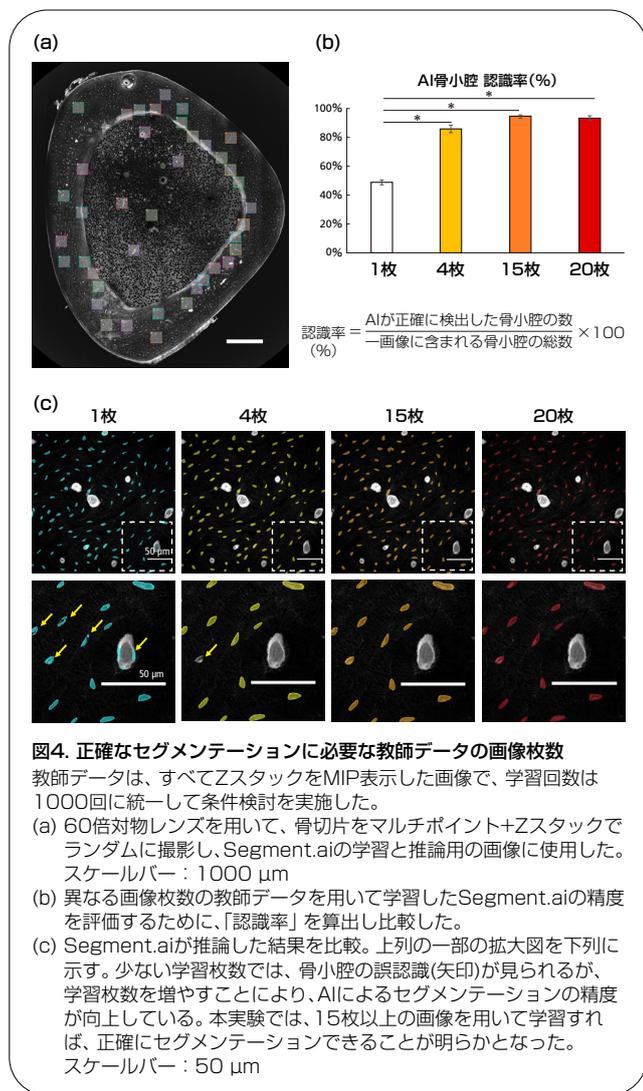
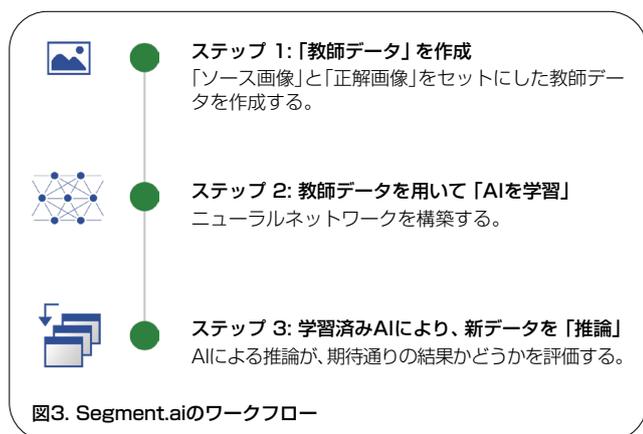
Villanueva染色したウサギ非脱灰骨切片を561 nmで励起し、その自家蛍光を共焦点顕微鏡で観察した。60倍対物レンズを使用し、Zスタック撮影した画像をMIPで表示している。スケールバー：50 μm

- (a) 観察した骨は、組織学的に「ハバース層板領域」「内基礎層板領域」「骨髄」で構成されることがわかる。
 (b) 従来の二値化法によるセグメンテーションの結果(青色)。骨細管や骨髄など、骨小腔以外の構造も検出している(矢印)。正確な計測を行うためには、手作業でのマスクの修正や削除が必要である。
 (c) Segment.aiによるセグメンテーションの結果(オレンジ色)。骨小腔の領域を学習したSegment.aiにより、目的の骨小腔のみが検出されている。

Segment.aiのワークフローは、3つのステップで構成される(図3)。Segment.aiの学習には、骨小腔の領域を手書きで二値化処理した「正解画像」と、二値化処理する前の「ソース画像」をセットにし、教師データとして用いた。

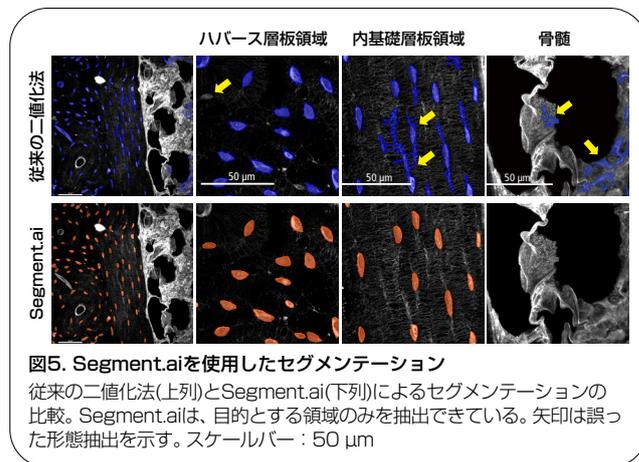
Segment.aiの精度に関わるパラメーターの一つとして教師データの「画像枚数」がある。本実験では、まず骨切片の様々な部位をランダムに多点撮影し、画像バリエーションを増やした。次に、これらの画像を用いて教師データを作成した。教師データは、画像枚数を変えて4種類作成し、これらのデータを用いてSegment.aiを学習させた。そして、学習を終えたAIに新しい画像を与え、期待通りの推論結果が得られるかどうかを評価した。

その結果、15枚以上の教師データを使用してSegment.aiを学習させることにより、95%の正確さで骨小腔が抽出できることが明らかとなった(図4)。



まとめ

骨組織の解析法のスタンダードである骨形態計測法では、骨切片の明視野画像を取得し、手動で計測するため熟練を要する。蛍光画像を用いた輝度値の二値化による自動認識を試みる場合も、正確にセグメンテーションするためには、手作業に頼る必要があった。Segment.aiを使用することにより、手作業でのセグメンテーションは不要となり、主観的な解析ではなく、客観的な評価が可能となる(図5)。たとえ熟練者でなくとも正確な解析が行え、大量のデータ処理が可能になるため、バイアスのない解析と作業の効率化が期待できる(参考文献1, 2)。



参考文献

1. Takanori Sato, Aya Takakura, Ji-Won Lee, Kazuaki Tokunaga, Haruka Matsumori, Ryoko Takao-Kawabata, Tadahiro Iimura *Microscopy* (Oxf). 2021 Jun 8; dfab020
2. Aya Takakura, Takanori Sato, Ji-Won Lee, Kyoko Hirano, Ryoko Takao-Kawabata, Toshinori Ishizuya, Tadahiro Iimura *Scientific Reports*, Volume 12, Article number: 16799 (2022)

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

AX/AX Rは、従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25 mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に取得でき、光毒性を低減します。AX Rのレゾナントスキャナーは、2K x 2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム(2048 x 16画素)の高速取得により、生きたサンプルの動態を逃さずとらえます。



顕微鏡AIモジュール NIS.ai

画像統合ソフトウェア「NIS-Elements」を拡張する、画像処理・解析モジュール。Enhance.aiとConvert.ai、Segment.aiが含まれます。Segment.aiは、従来の二値化ではターゲット抽出が難しいケースや手作業が必要なケースに、新たなソリューションを提供します。

