画像処理で評価されたミリポア DOPH 膜の表面構造

三沢 顕次・有沢 準二

北海道工業大学工学部応用電子工学科 〒006 札幌市西区手稲前田 419-2

Surface Structure of Millipore-DOPH Artificial Membrane Estimated by Image Processing

Kenji MISAWA and Junji ARISAWA

Department of Applied Electronics, Faculty of Engineering,
Hokkaido Institute of Technology, Sapporo 006, Japan

The surface structure of an artificial membrane composed of a Millipore filter and a synthetic lipid analogue, dioleoylphosphate (DOPH), immersed in KCl solution changes from a highly reflective hydrophilic state to a poorly reflective hydrophobic state by increase of calcium ion concentration in KCl solution. Using a microscopic digital image processing system the structural changes can be estimated quantitatively, such as a histogram of the brightness level and a binary black-and-white picture. The gross area of hydrophilic domains and the mean diameter of hydrophilic particles were measured by processing a binary picture.

Key words : Artificial membrane, Ca^{2+} ion, Structural change, Image processing

1. はじめに

生命の基本単位である細胞は、それを覆っている細胞膜によって、他の細胞や組織液などから区分されている。この細胞膜では、二分子膜を形成するリン脂質とそれに組み込まれたタンパク質が主要成分である。この二つの成分の役割としては、これまで、リン脂質が膜の基本構造を構成し、タンパク質が細胞の刺激応答機能を担っているものと考えられてきた。しかし近年になって、刺激応答にはタンパク質ばかりでなくリン脂質も関わっていることが見つかると、その役割が再び注目されている¹⁾。また、この刺激応答現象にはカルシウムイオンが重要な作用をしていると考えられており^{1, 2)}、電気生理学的手法あるいは光学的手法などにより検討されている³⁾。

合成リン脂質類似物質の dioleoylphosphate (DOPH) をミリポアフィルタに付着させたミリポア DOPH 生体

モデル膜は⁴⁾、カルシウムイオンの作用でその電気抵抗が約 10^4 倍も増加して数 $\text{M}\Omega$ の高抵抗状態になり、しかもこの状態の膜に電気刺激と圧力刺激を印加すると生体の機械的受容器と類似したパルス状の持続振動を起こす⁵⁾。また、実体顕微鏡による膜の表面構造観察から、この現象には親水性状態から疎水性状態への構造変化を伴い⁶⁾、その変化度合いはカルシウムイオンの濃度に依存することが明らかとなっている⁷⁾。しかし従来、この変化は写真画像と膜の反射光強度というアナログ量として計測されていたため、これに伴う形態変化の定量的な解析・評価が十分にできなかった。

そこで筆者らは、今回、新たにデジタル画像処理装置を導入して、この形態変化の定量化を試みた。その結果、親水性状態の画像と疎水性状態の画像を比較すると、画像の濃淡分布・平均粒子径・親水部と疎水部の面積などが明らかに異なっており、構造変化に対するカル

Fig. 1 Experimental apparatus and image processing system

Fig. 3 Surface structure of the hydrophobic membrane

シウムイオンの効果を膜画像の具体的な特徴量として評価することが可能になったので報告する。

2. システムと実験方法

本研究の実験および解析システムは、膜表面構造観察用の実体顕微鏡を基本として、これに画像処理用の顕微鏡テレビカメラ、同モニタ、ビデオデッキ、画像処理装置、同モニタおよびパーソナルコンピュータを組合せて構成した。Fig. 1 にその概略を示す。なお、ここで、画像処理装置は ADS, PIP-4000, コンピュータは NEC, PC-9801 VX を使用した。

実験は、公称空孔径 $8\mu\text{m}$ のフィルタで作成したモデ

Fig. 2 Surface structure of the hydrophilic membrane

Fig. 4 Surface structure of the intermediate membrane

ル膜⁶⁾を2枚のガスケットで挟み、これをシャーレ中で水平に固定する、次に、膜の上部を 300 mM KCl と任意の CaCl_2 濃度の混合溶液で浸す、2 分後にその溶液を取り去って、膜の表面構造を実体顕微鏡で拡大観察する。テレビカメラで撮影したこの画像を直接的に、またはビデオデッキを介して間接的に、画像処理装置のメモリに格納し、パーソナルコンピュータを用いて解析を行なう。画像の取込みサイズは 400×400 画素で、その輝度分解能は 8 ビットの 256 段階である。

3. 実験結果と検討

3.1 カルシウムイオンによる膜構造変化

塩濃度が 40 mM 以上の KCl 溶液中では、ミリポア DOPH 膜の電気抵抗は数百 Ω の値を示す⁴⁻⁶⁾。また、

Fig. 5 Histogram of brightness levels in the hydrophilic picture

Fig. 6 Histogram of brightness levels in the hydrophobic picture

このとき膜の表面構造は DOPH 分子と塩溶液の親和性が高まって親水性の状態になる⁶⁾。この状態から、KCl 溶液中の CaCl_2 濃度のみを徐々に高めていくと、膜の電気抵抗はある濃度で数桁も増加して数 $\text{M}\Omega$ の高抵抗状態へ遷移する⁵⁾。これに伴って、DOPH 分子と塩溶液の親和性が著しく低下して、膜の表面構造は疎水性の状態へ変化する⁶⁾。

次に、このような構造変化を顕微鏡の写真画像として観察した例を示す。Fig. 2 は塩溶液が 300 mM KCl のみの場合に観察された膜の表面構造で、塩溶液を含んだ部位が反射して白く見えている⁷⁾。また Fig. 3 は、300 mM KCl 溶液中の CaCl_2 濃度を 2.5 mM とした場合に観察された膜の表面構造で、Fig. 2 に比べて白い部位が大きく減少している。このような Fig. 2 と Fig. 3 の表面状態を、ここではそれぞれ、親水性状態および疎水性状態と呼ぶ。また Fig. 4 は、 CaCl_2 濃度を 0.5 mM にした場合であり、親水性の部位と疎水性の部位が混在した表面状態になっているので、親水性と疎水性の中間状態と呼ぶ。

本研究では、このような三つの特徴的な表面構造、すなわち親水性の状態、疎水性の状態、親水性と疎水性の中間状態を画像処理装置に取込んで解析を行なった。

3・2 膜表面画像の濃淡分布

ここでは、取込んだ三つの膜表面画像の特徴量として、画像の濃淡情報を輝度レベルのヒストグラム（度数分布）として表す。ただし、ここで度数は同じ輝度の画素が画像の中に何個あるかを表している。なお、一画面は縦、横それぞれ 400 画素で取込み、その全画素数は 16 万個である。また、画像の取込みスケールと実寸の関係は一例を Fig. 4 に示す。

次に示すヒストグラムはそれぞれ、Fig. 5 が Fig. 2 で見られた親水性状態の場合、Fig. 6 が Fig. 3 で見られた疎水性状態の場合、Fig. 7 が Fig. 4 で見られた中間状態の場合である。これらの結果から、各状態における特徴を述べていく。

まず Fig. 5 から、親水性状態の画像では、画素が輝

Fig. 7 Histogram of brightness levels in the intermediate picture

Table 1. Elements estimated by image processing

original picture	Fig. 2	Fig. 3	Fig. 4
hydrophilic domains (%)	51.3	0.7	35.0
hydrophilic particles	400	241	351
mean diameter of particles (μm)	12.1	3.6	6.8

度レベル 10~105 の間に分布しており、そのピーク値は輝度レベル 24 の 6,100 個であることがわかる。次に Fig. 6 から、疎水性状態の画像では、画素が輝度レベル 10~40 の間に分布し、そのピーク値は輝度レベル 14 の 21,200 個であることがわかる。同様に Fig. 7 から、中間状態の画像では輝度分布が親水性状態と同じ範囲にあり、画素のピークはレベル 14~18 でその値は 9,200 個である。

Fig. 8 Binary black-and-white picture of fig. 4

これから、例えば Fig. 5 と Fig. 6 を対比させてみると、輝度の分布範囲は疎水性画像が親水性画像の半分以下であり、またそのピーク値は疎水性画像が親水性画像の 3 倍以上も大きい、というように画像の濃淡を定量的に評価することができる。Fig. 2 から Fig. 4 の三つの膜状態は写真画像からでもその違いを認識できるが、このように画像の濃淡計測を行なうことで、より具体的にその特徴を輝度レベルの違いとして表すことができる。

3・3 2 値化処理による画像計測

前節で示したように、Fig. 2 から Fig. 4 の各状態の画像では、画像を構成する各画素の輝度がある範囲に分布している。このような濃淡画像からある粒子の面積や直径などを画像処理によって求める場合は、一般的には画像をある閾値の輝度レベルで黒と白の領域に 2 値化処理し、その 2 値画像から計測するという手法が取られる^{8, 9)}。閾値の決定については、輝度レベル分布の谷から求めるなどの方法があるが^{8, 9)}、今回のような画像ではヒストグラムから簡単にその値を見いだせないの、以下の方法を取った。

膜の明るさを反射光の強度として計測する従来の手法によれば⁹⁾、Fig. 2 の親水性状態の強度を 100% とすると Fig. 3 の疎水性状態の強度は 50% と評価できる。このとき顕微鏡の同軸落射光源の強度は一定なので、白く見える反射領域が 50% 減少したと等価的に考えてもよい。

そこで親水性と疎水性の二つの 2 値画像から反射領域である白い部位の面積をそれぞれ求めた場合に、これらの差が 50% と最も近くなる輝度レベルを 2 値化処理の閾値とすることにした。このような観点から 2 値化レベルを 25 から 40 まで変えて比較検討した結果、最も妥当な閾値は 32 であった。

次に、2 値画像の一例として、Fig. 4 の中間状態の原画像を輝度レベル 32 で 2 値化処理し、プリンタで出力したものを Fig. 8 に示す。また、こうして求めた親水性、疎水性、中間状態の三つの 2 値画像から、輝度レベル 32 以上の白い部位（親水性の領域）の面積率、粒子数、平均粒子径を計測した結果を Table 1 に示す。ここで、面積率は画像における白い部位の割合を、粒子数は白い部位が一個の固まりと認識できる個数を、平均粒子径は個々の粒子の周囲長を用いてこれを円とみなした時の直径を表している。

これから、輝度レベル 32 で 2 値化処理を行うと、このレベル以上の白い親水領域の面積率は Fig. 2 で 51.3%、Fig. 3 で 0.7%、Fig. 4 で 35% と評価でき、疎水性の画像になるほど親水領域の面積が急激に減少していることがわかる。また、輝度レベル 32 以上の独立的に観察される粒子の数は Fig. 2 で 400 個、Fig. 3 で 241 個、Fig. 4 で 351 個あり、それらの平均粒子径は Fig. 2 が $12.1\mu\text{m}$ 、Fig. 3 が $3.6\mu\text{m}$ 、Fig. 4 が $6.8\mu\text{m}$ と計測され、疎水性画像になるほど粒子径が著しく小さくなっていることがわかる。このように、画像計測を行なうことで、各状態における膜表面の形態情報が数値として具体的に定量化できた。

4. むすび

ミリポリア DOPH 生体モデル膜は、カルシウムイオンの作用で、その表面構造が親水性状態から疎水性状態へ

と変化する。従来、この変化は膜の反射光強度（アナログ量）として計測されていたため、膜表面の形態情報を直接定量化することは困難であった。

そこで、今回、デジタル画像処理装置を導入して構造変化に伴う膜画像を取込み、画像の濃淡情報や粒子径・面積率などの形態情報の計測を試みた。その結果、これらの情報を定量的に評価することが可能になった。また、膜構造変化の解析に対して画像計測は一つの有効な手段であることが確認された。

人工膜や生体膜における画像処理の試みは、今回我々が行なった形態解析の他に、蛍光物質をプローブとした解析もなされている¹⁰⁾。今後は、このシステムを発展させて、膜の形態情報から膜面の脂質形状を推測したりカルシウムイオンの濃度情報などの二次的な情報も検出できるようにしたい。

なお、本研究の一部は文部省科研費 (No.62750396) および秋山記念生命科学振興財団の助成を受けた。記して、ここに感謝する。

文 献

- 1) 例えば日高弘義編：“カルシウムシグナリングの分子制御”，細胞工学別冊 3，秀潤社 (1987)
- 2) 大森治紀：膜，**12** (1)，2 (1987)
- 3) 平本幸男，竹中敏文編：“電気的測定法”，実験生物学講座 5，丸善 (1982)
- 4) Y. Kobatake, A. Irimajiri & N. Matsumoto : Biophys. J., **10**, 728 (1970)
- 5) 有沢準二，古川友三：電子通信学会論文誌，**62 C** (1)，645 (1979)
- 6) 三沢顕次，有沢準二：膜，**11** (5)，297 (1986)
- 7) 三沢顕次，有沢準二：膜，**12** (2)，89 (1987)
- 8) 辻内順平編：“応用画像解析”，共立出版 (1982)
- 9) 的崎 健，周藤安造：“医用画像処理”，コロナ社 (1986)
- 10) 鈴木正康：細胞工学，**7** (6)，464 (1988)

(受付 1989. 3. 27)