

AI 画像処理技術を活用したミトコンドリアの詳細解析

門井宏平, 武居俊輔

Detailed Analysis of Mitochondria using AI Image Processing Technology

Kohei KADOI and Shunsuke TAKEI

ミトコンドリアは主要な細胞内小器官の一つであり、エネルギー代謝を司るため基礎研究分野のみならず創薬開発等の応用分野で幅広く研究されている。ミトコンドリアの研究では、ミトコンドリアを蛍光分子で標識し解析する手法が主流であり、動態の解析にはタイムラプス撮影が不可欠である。しかし、蛍光観察では蛍光分子の励起を行うことにより、光毒性によるミトコンドリア活性や形態への影響、蛍光の褪色が生じ得る。また、ミトコンドリアは微細な構造であるため、定量解析を行う場合には鮮明な画像を用意する必要がある。このため、可能な限り低い励起光強度や短時間露光の条件で、細胞へのダメージや蛍光褪色を回避し、鮮明な画像を得る技術が求められている。

顕微鏡画像統合ソフトウェア NIS-Elements は artificial intelligence (AI) の一種である深層学習技術を用いた画像処理機能 (NIS.ai) を搭載している。本稿では、低い励起光強度で取得した不明瞭な画像から明瞭な画像を生成する機能 (Enhance.ai) を用いることで、ミトコンドリア解析における光毒性を回避できる効果を確認した。さらに、焦点面外から発せられる蛍光シグナルを除去する機能 (Clarify.ai) もミトコンドリアの定量解析に有用であることを示した。これらの技術により、従来よりも正確かつ詳細なミトコンドリア動態解析が可能になり、現象解明への寄与が期待される。

Mitochondria, which are one of the major organelles for controlling energy metabolism, have been extensively studied in the fields of basic and applied research of biology, drug discovery research, and so on. Mitochondrial studies generally utilize the method of staining with fluorescent molecules while time-lapse imaging is indispensable for analyzing mitochondrial dynamics. However, in fluorescence experiments, the excitation of fluorescent molecules may affect mitochondrial activity and morphology owing to phototoxicity and fluorescence photo bleaching. In addition, owing to the fine structure of mitochondria, it is necessary to prepare a clear image when performing quantitative analysis. Therefore, a technique for obtaining clear images which avoids damage to cells and fluorescence photo bleaching under the conditions of excitation light intensity and short exposure as low as possible is desired.

The NIS-Elements imaging software for microscope, is implemented with an image processing function using deep learning technology (NIS.ai). In this study, we confirmed the effect of avoiding phototoxicity in mitochondrial analysis by using the function (Enhance.ai) to generate a clear image from an unclear image acquired using low excitation light intensity. Furthermore, it was shown that the function for removing blurred light from outside the focal plane (Clarify.ai) is also useful for the quantitative analysis of mitochondria. These technologies enable more accurate and detailed mitochondrial dynamics analysis than before, and are expected to contribute to the elucidation of phenomena.

Key words ライフサイエンス, 顕微鏡, 画像処理, 深層学習, ミトコンドリア
life science, microscopy, image analysis, deep learning, mitochondria

1 はじめに

ライフサイエンスの分野において、生物顕微鏡で取得した標本画像のデジタル画像処理は広く一般に行われる。また、近年では、深層学習技術を用いた様々な画像処理技術が検討されている。これらの技術は、取得画像の画質改善機能等として提案され、生物標本への影響の少ない条件での撮影の実現や定量解析における効率向上効果が見込まれるため、多様な研究分野の応用が期待されている。

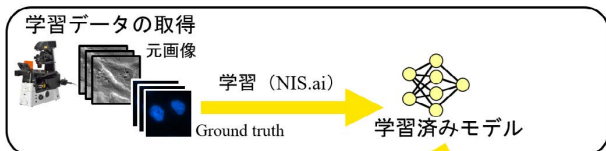
NIS-Elements は、顕微鏡やカメラの制御、画像処理、解析、レポート機能を備えた顕微鏡システム用の画像統合ソフトウェアである。NIS-Elements における深層学習技術を応用した顕微鏡画像処理機能 (NIS.ai) として、ニコンはこれまでにいくつかの機能を実装してきた。本稿では、生物標本への染色処理等による影響の少ない条件で撮影した不鮮明な画像から鮮明な画像を生成する機能 (Enhance.ai) の他、複数の NIS.ai 機能の有効な適用事例を、ミトコンドリア研究に焦点を当て紹介する。

2 ミトコンドリア研究の重要性と課題

ミトコンドリアは細胞内小器官の一つであり、生物の活動に用いられるエネルギー生成の場として重要な役割を担う。そのため、ミトコンドリアの活性や品質維持機構は多様な疾患に関わることが知られており、基礎研究から創薬・応用研究まで広く着目されている [1]。

顕微鏡を用いたタイムラプス観察は、経時的に変化する生物現象をリアルタイムに可視化できる。そのため、形態や挙動の経時変化が解析指標になるミトコンドリア研究に顕微鏡タイムラプス撮影は不可欠な手法である [2]。しかし、ミトコンドリアの可視化には蛍光染色が用いられ、定量解析が可能な明瞭な蛍光画像の取得には強い励起光強度や長時間露光が必要となる。タイムラプス撮影では度重なる励起光の照射により、褪色や活性酸素種の産生による光毒性の影響は避けられない [3]。これにより、褪色による構造の検出や定量精度の低下、または細胞にダメージが生じて観察対象となる生物現象にも影響を与える懸念がある [4]。一方で、光毒性や褪色の回避のために励起光強度を抑え露光時間を短くした場合、ミトコンドリアの形態を検出可能な鮮明な画像の取得が困難となる。このため、可能な限り低い励起光強度や短時間露光の条件で、細胞へのダメージや蛍光褪色を回避し、鮮明な画像を得る技術が求められている。

学習フェーズ



推論フェーズ

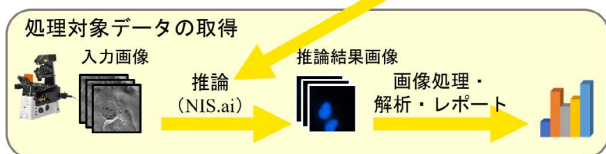


Fig. 1 NIS.ai を用いた学習・推論の流れ

3 AI 画像処理技術とミトコンドリアのタイムラプス形態解析

NIS.ai は深層学習の一種である Convolutional Neural Network を用いており、学習データを必要とする supervised 型の学習を採用している。ユーザーが学習させることが可能である機能も複数提供しており、Enhance.ai もその一機能である。学習を要する Enhance.ai 他による処理は、ユーザーが準備した学習用データを用いて学習済みモデルを学習する学習フェーズと、学習した結果を利用して対象データ（入力画像）から目的の画像を出力する推論フェーズの二つのフェーズから成り立つ (Fig. 1)。Enhance.ai は

バックグラウンド領域とシグナル領域の蛍光強度の差が小さい不明瞭な低 Signal / Noise (S/N) 蛍光画像と明瞭な高 S/N 蛍光画像のペアを学習データとして学習させる。これにより作成された学習モデルを、処理対象とする低 S/N 蛍光画像に適用することで高 S/N 蛍光画像が得られる。Fig. 2 左の蛍光画像はミトコンドリアを標識した低 S/N 蛍光画像で、コントラスト調整で強調すると、ノイズが強調された不鮮明な画像になる。その画像に対し Enhance.ai を適用することで、Fig. 2 右画像で示したように個々のミトコンドリアを観察可能な高 S/N 画像が得られる。

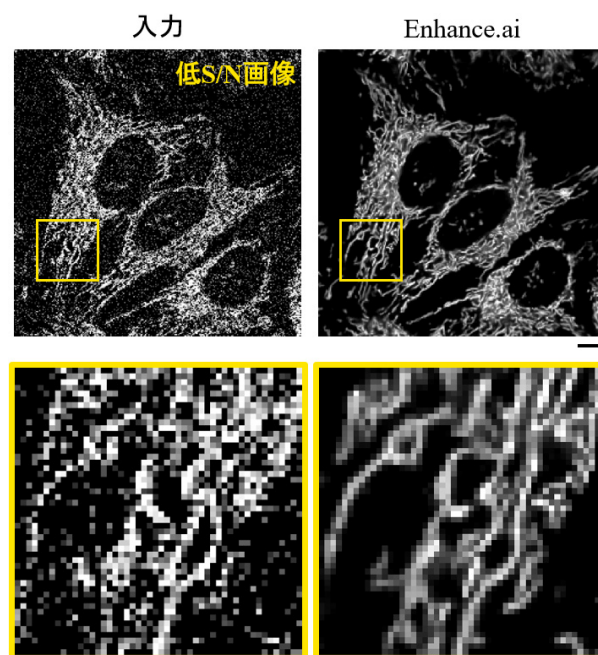


Fig. 2 Enhance.ai を用いた低 S/N 画像の高 S/N 化
入力：Enhance.ai に入力した低 S/N 蛍光画像。Enhance.ai: Enhance.ai による推論結果。下段は上段の黄四角領域の拡大画像。スケールバーはそれぞれ 10 μ m。

そこで、蛍光の励起光強度を抑えて Enhance.ai を用いることによるミトコンドリア形態への効果を検証するため、共焦点顕微鏡を用いて、励起光となるレーザー強度の調整により高 S/N 画像を取得した条件と、レーザー強度を最低限に設定することで低 S/N 画像が得られる条件で、それぞれ10秒ごと120分のタイムラプス画像を取得した。低 S/N 条件画像に対しては Enhance.ai を適用した。

その結果、レーザー強度の調整により高 S/N 画像を取得した場合、ミトコンドリアは観察開始から10分程度で光毒性が顕在化し、120分後には断片化が進行し完全に崩壊していることが確認された (Fig. 3 (a), (d))。これは、励起光による光毒性がミトコンドリアや細胞本来の機能に大きな影響を及ぼしたものと考えられる。一方、最低限のレーザー強度で蛍光画像を取得した場合、不明瞭な画像が得られた (Fig. 3 (b), (e)) が、Enhance.ai により個々のミトコンドリアが非常に明瞭となった (Fig. 3 (c), (f))。また、観

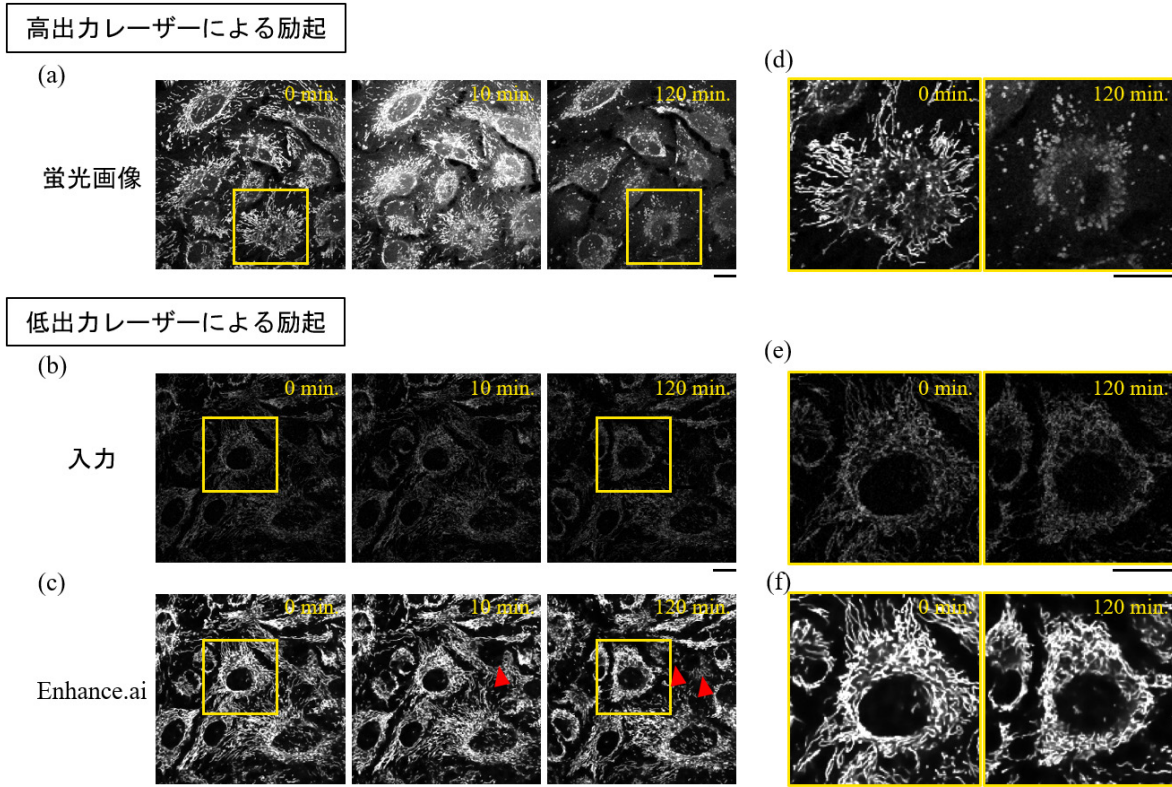


Fig. 3 励起光によるミトコンドリア様態比較と Enhance.ai 出力

(a-c) 10秒ごとに撮影したタイムラプスの0分（左）、10分（中央）、120分（右）時点の画像。スケールバーは20 μm。
 (a) 高出力レーザーにより励起された MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) 蛍光画像。
 (b) 低出力レーザーにより励起された MitoTracker Red CMXRos 蛍光画像。Enhance.ai への入力画像として使用した。(a)と比較し、コントラスト設定を4倍に上げた。
 (c) (b)を入力画像として Enhance.ai を使用した出力画像。(a)とコントラストを合わせた。赤矢尻は細胞分裂が進行している細胞を示した。
 (d-f) それぞれ (a-c) 画像内の黄四角領域の拡大画像。スケールバーは20 μm。

察開始から120分後もミトコンドリアの断片化や褪色による画質の変化は生じなかった。さらに、120分間の観察の中で、細胞分裂の進行も確認され (Fig. 3 (c), 赤矢尻)、細胞全体として通常の機能が維持できていることが示唆された。

次に、ミトコンドリア形態の経時変化を定量的に評価した (Fig. 4)。定量解析には NIS-Elements の画像処理、計測機能である General Analysis 3を用いた。Enhance.ai により明瞭となった画像を画像解析に用いることで、ミトコンドリアの形態を正確に捉え、計測が可能となった (Fig. 5)。計測項目としてミトコンドリア領域を検出した画像視野内のミトコンドリア長さの総和と、細胞当りのミトコンドリア長さの総和の変化率を算出し、経時変化を観測した。視野内の細胞数は、NIS.ai 機能の一つである Convert.ai 機能を用いてミトコンドリアの蛍光画像から細胞核領域を検出し、定量した。その結果、強いレーザー強度での観察では、観察開始後10分程度からミトコンドリアの形態の変化が生じ、光毒性の影響が定量的に示された。一方で、最低限のレーザー強度で画像を取得し Enhance.ai を使用した場合、120分間の観察を通してミトコンドリアの長さが一定で維持

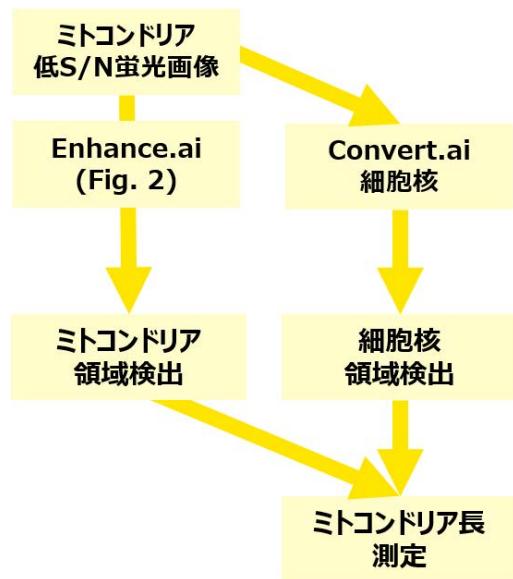


Fig. 4 Enhance.ai を用いたミトコンドリア解析の流れ

されることが示された (Fig. 6)。

以上の結果から、Enhance.ai 機能を用いることで、光毒性によるミトコンドリアへの影響を回避し、定量的な形態

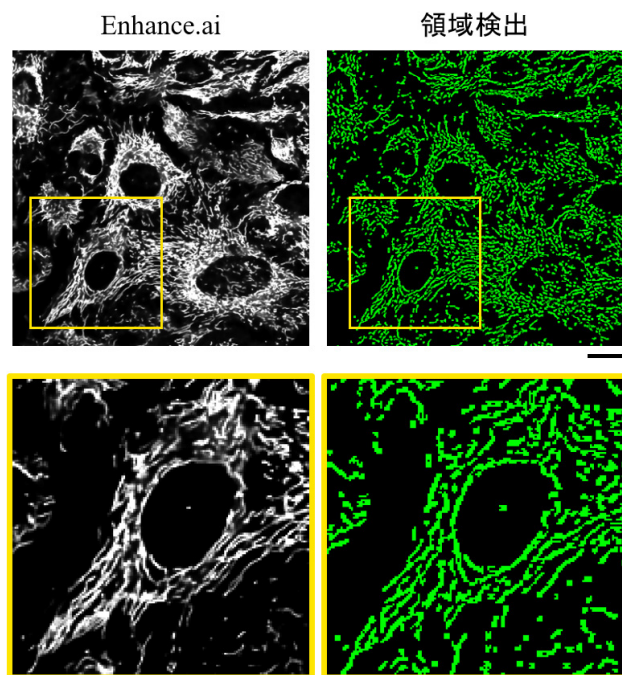


Fig. 5 Enhance.ai 出力画像を用いたミトコンドリア領域の検出
Enhance.ai: Enhance.ai 出力結果. 領域検出: General Analysis
機能を用いて検出したミトコンドリア領域. 下段は上段の黄四
角領域の拡大画像. スケールバーはそれぞれ 20 μm .

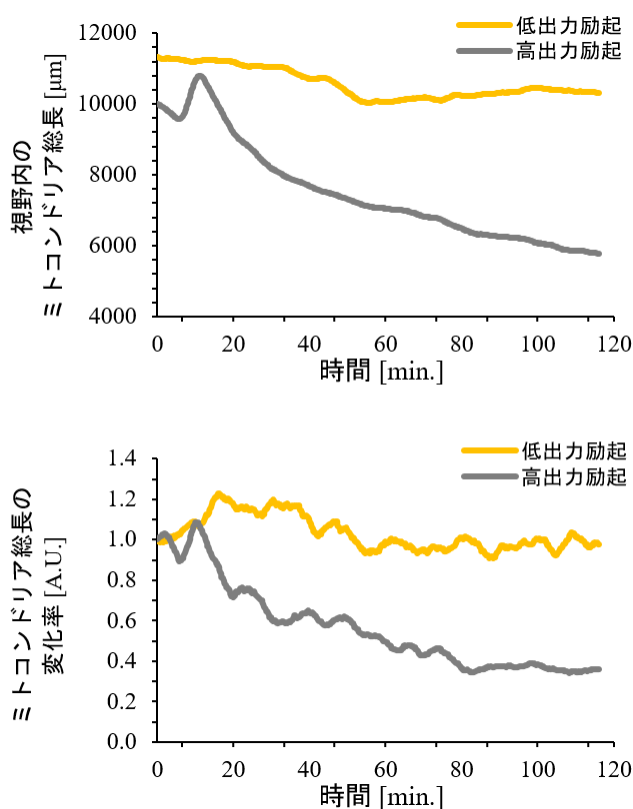


Fig. 6 ミトコンドリア形態の経時変化の定量

視野内のミトコンドリア総長 [μm] (上) とミトコンドリア総長の変化率 [A.U.] の経時変化を示したグラフ. 低出力で蛍光を励起し取得した画像に Enhance.ai を使用した結果 (黄) と高出力で蛍光を励起して取得した画像を使用した結果 (灰). 時間間隔は10秒.

の解析が可能であることが示された. そのため, Enhance.ai は長時間に及ぶミトコンドリアの品質評価や, ミトコンドリアや関連分子の詳細な動態の解析へ有効なツールであり, ミトコンドリアを対象とした基礎研究や創薬研究への活用が期待される.

4 その他 AI 機能のミトコンドリア解析への活用事例

NIS.ai の一機能である Clarify.ai は学習を必要とせずに, 焦点外から発せられる蛍光成分を取り除く画質改善機能である. 共焦点顕微鏡を用いて撮影した画像と比較して, 通常の落射型蛍光顕微鏡を用いて CMOS イメージセンサーを搭載したカメラで画像を取得した場合, 焦点外から発せられる蛍光成分の漏れ込みにより像が滲む場合がある. 細胞内でミトコンドリアは XY 方向のみでなく, Z 軸方向にも伸展, 分布するため, 焦点外から発せられる蛍光成分の漏れ込みが生じ得る. 焦点外からの蛍光成分を多く含むミトコンドリア画像を取得すると, 画像処理によりミトコンドリアの領域検出を正確に行うことが困難である. そのような画像を Clarify.ai へ入力することにより, 焦点内の像が明瞭な画像が得られる (Fig. 7). そのため, 共焦点顕微鏡のような Z 分解能の高い顕微鏡観察法を用いることなく, ミトコンドリア領域を検出し定量することが可能である.

その他にも, NIS.ai は画像の入力から目的の領域を直接抽出する Segment.ai 機能や, 非染色画像の入力から蛍光画像を出力する用途に使用可能な Convert.ai 機能を有する.

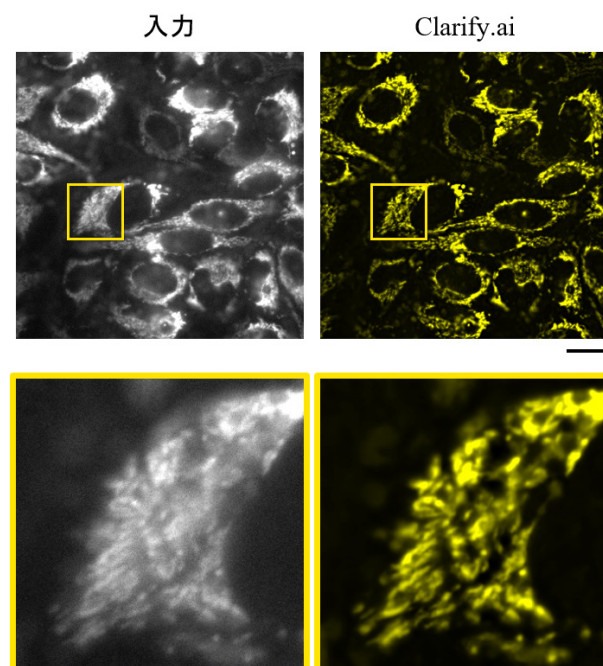


Fig. 7 Clarify.ai を用いたミトコンドリア蛍光画像の鮮明化
入力: Clarify.ai に入力した焦点外からの漏れ光の多い画像.
Clarify.ai: Clarify.ai による推論結果. 下段は上段の黄四角領域
の拡大画像. スケールバーはそれぞれ 20 μm .

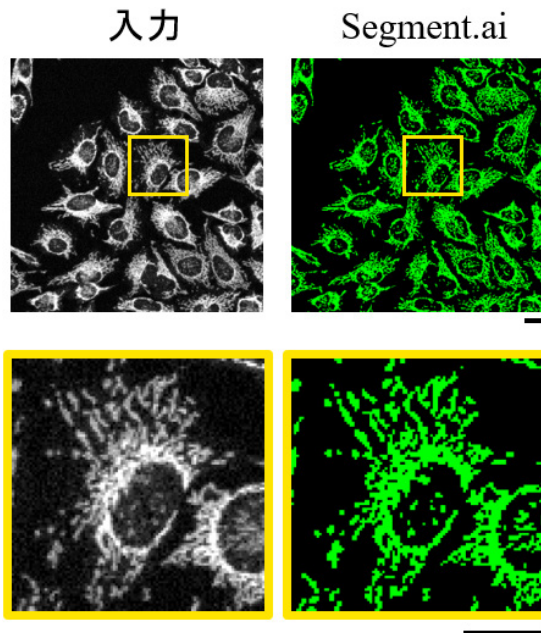


Fig. 8 Segment.ai を用いたミトコンドリア領域の検出
 入力：Segment.ai に入力した蛍光画像。Segment.ai: Segment.ai により検出されたミトコンドリア領域。下段は上段の黄四角領域の拡大画像。スケールバーはそれぞれ 20 μm 。

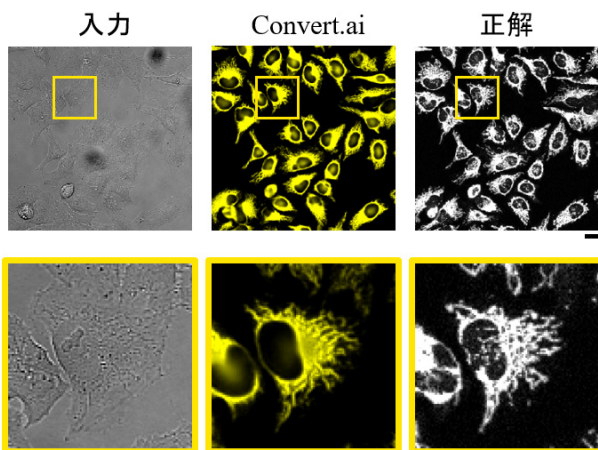


Fig. 9 Convert.ai を用いた透過明視野画像からのミトコンドリア蛍光画像生成

入力：Convert.ai に入力した透過明視野画像。Convert.ai: Convert.ai により生成されたミトコンドリア蛍光画像。正解：正解となる実蛍光画像。下段は上段の黄四角領域の拡大画像。スケールバーはそれぞれ 20 μm 。

Segment.ai を用いると、例えば蛍光画像と手書きで作成した抽出領域を学習させることにより、ミトコンドリアのような複雑な形態の構造を、高度な画像解析技術の検討無しに領域抽出を行うことが可能となる (Fig. 8)。また、Convert.ai に明視野画像と蛍光画像をセットで学習させることで、ラベルフリー標本の明視野画像から、蛍光画像を生成可能である (Fig. 9)。このようなデジタルステイン技術には、標本や対象とする細胞内構造に向き不向きがあるが [5]、適用可能な標本の場合、光毒性の低減や染色試薬による毒性を完全に取り除くことが可能である。

5 材料概要

紹介した検証に用いた細胞、顕微鏡、NIS.ai 機能の概要は下記 (Table 1) である。

Table 1 実験材料概要

	Fig. 2, 3	Fig. 7	Fig. 8	Fig. 9
細胞	HeLa cells			
顕微鏡	Eclipse Ti2-E			
蛍光撮影	共焦点 (A1R)	落射照明 (CMOS)	共焦点 (A1R)	共焦点 (A1R)
対物倍率	60x	100x	20x	20x
NIS.ai 機能	Enhance.ai	Clarify.ai	Segment.ai	Convert.ai
学習回数	1000	学習不要	1000	1000
入力画像	蛍光	蛍光	蛍光	明視野
出力画像	蛍光	蛍光	検出領域	蛍光

6 まとめ

NIS.ai により、強い励起光照射や長時間の露光を行わずに高 S/N 画像を得ることが可能である。これにより、従来は躊躇されていたような短いインターバルまたは長時間のタイムラプス観察、解析が容易となる。ミトコンドリアの例以外にも、細胞内の小胞輸送など高速な現象をとらえる必要のある研究への応用が見込まれる [6], [7]。また、細かい構造の検出の妨げとなっていた焦点外からの漏れ光除去も可能であるため、解析効率の向上への貢献も期待される。

引用文献

- [1] J. Nunnari and A. Suomalainen, "Mitochondria: in sickness and in health," *Cell*, vol. 148, pp. 1145-1159, 2012.
- [2] K. Mehta, L. A. Chacko, M. K. Chug, S. J. Jhunjunwala, and V. Ananthanarayanan, "Association of mitochondria with microtubules inhibits mitochondrial fission by precluding assembly of the fission protein Dnm1," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 10, pp. 3385-3396, 2019.
- [3] P. P. Laissue, R. A. Alghamdi, P. Tomancak, E. G. Reynaud, and H. Shroff, "Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging," *Nature methods*, vol. 14, no. 7, pp. 657-661, 2017.
- [4] M. M. Knight, S. R. Roberts, D. A. Lee, and D. L. Bader, "Live cell imaging using confocal microscopy inducing intracellular calcium transients and cell death," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 284, pp. 1083-1089, 2003.
- [5] C. Ounkomol, S. Seshamani, M. M. Maleclar, F. Collman, and G. R. Johnson, "Label-free prediction of three-dimen-

- sional fluorescence images from transmitted-light microscopy," *Nature methods*, vol. 15, pp. 917–920, 2018.
- [6] T. Tojima, Y. Suda, M. Ishii, K. Kurokawa, and A. Nakano, "Spatiotemporal dissection of the *trans*-Goldi network in budding yeast," *J. of Cell Science*, vol. 132, no. 15, jcs231159, 2019.
- [7] M. Rosendale and D. Perrais, "Imaging in focus: Imaging the dynamics of endocytosis," *Int. J. of Biochem. and Cell Biol.*, vol. 93, pp. 41–45, 2017.

門井宏平 Kohei KADOI
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solution Sector
Healthcare Business Unit

武居俊輔 Shunsuke TAKEI
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solution Sector
Healthcare Business Unit