

# 原著 顕微鏡画像を用いたヒト動脈の中膜に存在する 弾性線維の定量的計測法の検討

昭和大学医学部脳神経外科学講座

加藤 優\* 水谷 徹 飯塚 一樹  
久保美奈子 阪本 有

昭和大学医学部解剖学講座（肉眼解剖学部門）

大塚 成人 江連 博光 井上由理子

抄録：動脈の中膜に存在する弾性線維 elastic fiber (EF) の定量化については EF 数の計測という手法を用いた報告がいくつかある。しかし、市販の画像解析システムによる簡便な定量化の手法は確立されていない。本研究は市販の画像解析システムを用いて、EF を簡便に定量化する手法を確立しようとするものである。Elastica van Gieson (EVG) 染色の前田変法を施した総頸動脈の横断切片を顕微鏡に接続したデジタルカメラで撮影した。2種類の画像にしきい値の決定法の違いによる3つの画像処理を行い、各処理における計測領域内のEFの面積比を比較した。各画像処理のうち、計測領域サンプル全体のEFだけが抽出される輝度値を調べ、それをしきい値として2階調化する方法がデータのばらつきが小さく、EFの定量化に最適であった。市販の画像処理ソフトである Adobe Photoshop<sup>®</sup> や一般的な撮影機材または光学機材を用いて画像解析システムを構築し、血管壁などに存在するEFを簡便に定量化する手法が確立された。この手法の確立により、頸動脈に存在する弾性線維の部位別の含有量が明らかになり、動脈硬化や血栓症の病態や発症機序を解明するうえで有益な手法であると期待される。

キーワード：頸動脈、中膜、弾性線維、画像処理、Photoshop<sup>®</sup>

一般に動脈は内皮細胞を含む内膜、結合組織からなる中膜、外膜から構成されている。このうち中膜は主に平滑筋と細胞外マトリックスである膠原線維、弾性線維を含んでおり<sup>1)</sup>、それらの構成比率によって血管の機能が特徴づけられる。これらの中膜の組織の構成には部位差があることが知られており<sup>2)</sup>、末梢に行くにしたがい、弾性線維は減少し、平滑筋が増加していくことが知られている。すなわち弾性線維が豊富な弾性（弾性型）動脈から平滑筋が豊富な筋性（筋型）動脈に移行するとされる<sup>3)</sup>。頭頸部の主要な動脈である総頸動脈は弾性（弾性型）動脈であり、より末梢の内頸動脈や外頸動脈に行くにしたがって筋性（筋型）動脈に移行する<sup>3)</sup>。さらに、脳卒中の原因であるアテロームプラークは弾性動脈から筋性動脈の移行部の shear stress（ずり応力）が弱い部位に存在し、血管壁の性状が shear stress

に何らかの影響を与えていると考えられている<sup>4-6)</sup>。

一方、動脈の中膜に存在する弾性線維に関しては、定性的評価を行った報告<sup>7)</sup>、光学顕微鏡下で一視野あたりの本数を用いた分類<sup>8)</sup>、電子顕微鏡を用いた動脈の構造に関する報告<sup>9-10)</sup>がみられる。しかし、他の組織の定量化に使われているような画像解析的手法を用いた方法<sup>11)</sup>が十分に確立されているとはいえず、特に、一般に普及しているソフトウェアや機材を用いた画像解析システムを構築し、簡便に定量化する手法はこれまでに提示されていない。

本研究は総頸動脈の中膜に存在する弾性線維を一般的に普及している画像解析ソフトウェア（Photoshop<sup>®</sup>）や光学撮影機材を用いた画像解析システムを構築し、血管壁のEFの含有量を簡便に計測する手法を確立しようとするものである。

\*責任著者

## 研究方法

### 1. 試料採取と切片作製

10%ホルマリン液で固定された解剖実習献体1例(89歳, 女性)から, 右側の総頸動脈から頭蓋内内頸動脈までの部位を一塊として摘出した(Fig. 1). 摘出した血管から内頸動脈と外頸動脈の分岐部から14 mm下方の位置(Fig. 1)で総頸動脈の血管の横断全周を採取したのち, 自動包埋装置(SAKURA ETP-150CV, SAKURA, Chikuma, Japan)を使用してパラフィン包埋した. その後, 滑走型ミクロトームにて厚さ5  $\mu\text{m}$ の横断切片を作製し, Elastica van Gieson (EVG)染色の前田変法<sup>12)</sup>を施した. なお, 本研究は医学部医の倫理委員会の承認のもとに行われた.

### 2. 撮影に使用した機材とソフトウェア

画像の撮影に用いた機材は光学顕微鏡(OLYMPUS BX50, OLYMPUS Co Ltd, Tokyo, Japan), 対物レンズ(OLYMPUS UPlan FL 10X, OLYMPUS Co Ltd, Tokyo, Japan), Cマウントカメラアダプタ0.5 $\times$ (OLYMPUS U-TV0.5XC-3, OLYMPUS Co Ltd, Tokyo, Japan), 光学顕微鏡用デジタルカメラ(WRAYCAM NF1000, WRAYMER INC., Osaka, Japan)である.

画像解析にはIntel (R) Core (TM) i7-4770 CPU @3.40GHz, 16.0GB RAM, NVIDIA Quadro K600を搭載したMicrosoft Windows 7 Professional (64 Bit) (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA)をオペレーティングシステムとするコンピューターおよびPhotoshop<sup>®</sup> CS6 Extended (64 Bit) (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA)を使用した.

### 3. 画像の撮影とデジタル画像のフォーマット

光学顕微鏡の照明には均一な照明が得られるよう顕微鏡に標準的に使用されているケーラー照明を用いた.

デジタルカメラの設定解像度は1,824 $\times$ 1,362ピクセルとし, 保存形式はJPEG (Joint Photographic Experts Group)フォーマットの24ビットカラーに統一した. 露出補正はデジタルカメラ制御ソフト(WrayView, WRAYMER INC., Osaka, Japan)による自動露出とし, フォーカスの調節はデジタルカメラに接続されたコンピューターの液晶画面上で行った.

切片の撮影に際してはプレパラート作製時の血管壁の損傷が少ない部位を選び, 総頸動脈の中膜が全層

含まれるように5倍で撮影を行った. これらの撮影した画像からPhotoshop<sup>®</sup>を用いて256階調の24ビットカラー画像とグレースケール画像を生成し, 保存した.

なお, 本研究で扱う24ビットカラー画像とはPhotoshop<sup>®</sup>で扱う24ビットカラーであり, 赤(R), 緑(G), 青(B)をそれぞれ8ビットで表す. R, G, Bそれぞれは $2^8 = 256$ 階調で表され, 0~255の256階調で変化させることで, 全体では $2^{(8+8+8)} = 2^{24} = 16,777,216$ 色を表現することができる. また, グレースケール画像はPhotoshop<sup>®</sup>のグレースケール化コマンドにより生成されたもので, その処理はITU-R BT.709規格によるガンマ補正を行う方法である. ガンマ補正とは, 色のデータと実際に出力される際の信号の相対関係を調節して, より自然に近い表現を得るために行う補正である. Photoshop<sup>®</sup>のグレースケール化コマンドにおけるガンマ補正值は $\gamma = 2.2$ である.

4. 画像解析による弾性線維の定量化の方法と手順  
撮影した画像を以下の方法を用いて画像解析を行った.

なお, 本研究における画像解析の行程の概略をFig. 2に示した.

#### 1) Step 1 計測領域サンプルの抽出

撮影した画像から中膜中央部をマイクロメーターによる実測値で0.2 mm $\times$ 0.2 mm四方(303 $\times$ 303ピクセル相当)の計測領域サンプルを選択した.

#### 2) Step 2 弾性線維の抽出のためのしきい値の決定

EVG染色を施した動脈壁の構成成分のうち, 弾性線維が黒色に近く, 肉眼的に最も濃く染色されるという特徴を利用して, 計測領域サンプル内の24ビットカラー画像とグレースケール画像における輝度を用いて画像を評価し, 弾性線維の抽出を行った. なお, 輝度は0~255の256段階の整数値で示される画像の階調表現であり, 輝度0が最も暗く, 輝度255が最も明るい値である. また, その値は色による明るさの感じ方を考慮して加重平均した値であり, 四捨五入の処理を行って0~255の整数値として扱う.

輝度値による弾性線維の識別は, 弾性線維とそれ以外の組織との境界の輝度をしきい値とし, しきい値未満の輝度を持つピクセルを弾性線維とした. しきい値の決定に当たっては以下に記載する3通りの画像処理方法を設定した. それらを同一の24ビットカラー画像とグレースケール画像に適用し,

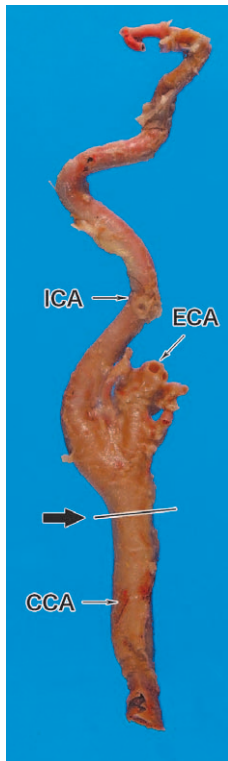


Fig. 1 Photograph of right carotid artery  
 Large arrow: sampling site for this study  
 CCA: common carotid artery  
 ECA: external carotid artery  
 ICA: internal carotid artery

計 6 通りの処理をそれぞれ 30 回ずつ行った。

(1) 画像処理 A：画像の計測領域サンプル内のしきい値を動かし、画像内の弾性線維だけが抽出される輝度値を調べ、それをしきい値とした。

(2) 画像処理 B：計測領域サンプルの一部の領域を 30 × 40 ピクセル (1,200 ピクセル) となるように拡大する。その拡大された領域内で弾性線維と判断した部分の周囲 100 ピクセル以上を選択し、その輝度値の平均 + 2SD をしきい値とした。

(3) 画像処理 C：計測領域サンプル内に存在するただ 1 本の弾性線維と直交する 1 列のピクセル群 (1 × 10 ~ 20 ピクセル) をモニター上で選択したのち、それらのピクセルの輝度値を調べ、弾性線維と判断されたピクセルで最も高い輝度値をしきい値とした。

3) Step 3 2 階調化

2 階調化処理によって輝度がしきい値未満のピクセルを黒、しきい値以上のピクセルを白に変換し、弾性線維の領域が黒となるように処理を行った。

4) Step 4 弾性線維の定量的計測

2 階調化した画像から計測領域サンプル内の平均輝度値を測定し、以下の式を用いて計測領域サンプル内における弾性線維の割合を面積比として算定した。

弾性線維の面積比

$$= \frac{255 - (\text{計測領域内の平均輝度値})}{255}$$

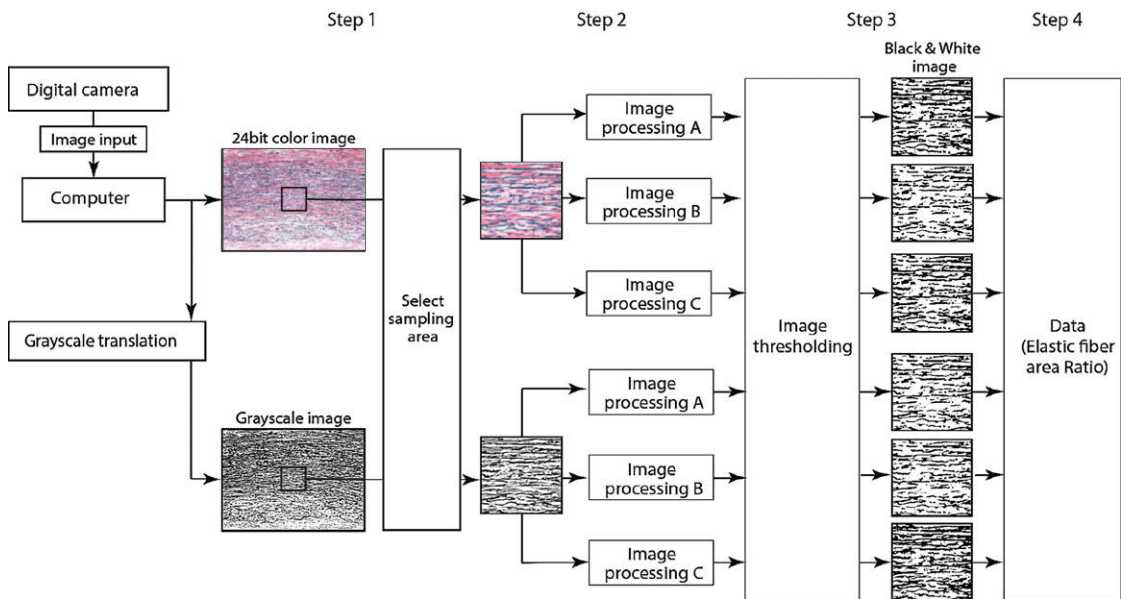


Fig. 2 Schematic explanation of the quantitative measuring method of the elastic fiber in this study



結 果

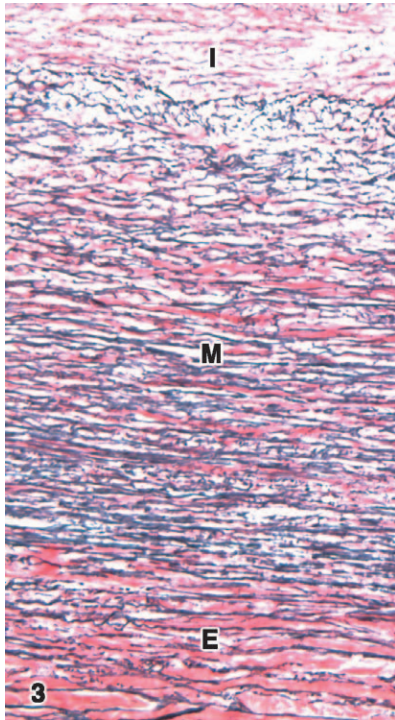


Fig. 3 Microscopic photograph of the arterial wall in the common carotid artery (elastica van Gieson stain modified by Maeda, magnification  $\times 5$ )  
 E: tunica externa  
 I: tunica intima  
 M: tunica media

EVG 染色の前田変法を施された動脈壁の切片の顕微鏡画像 (Fig. 3) を観察すると、弾性線維は濃紫色から黒色に染色され、その他の組織と容易に見分けることが可能であった。また、弾性線維の形態や分布は顕微鏡画像 (Fig. 4a) とグレースケール画像 (Fig. 4b)、画像処理後の 2 階調化画像 (Fig. 4c) とを比較すると視覚的にほぼ一致しており、画像上での弾性線維の抽出が容易であった。

これらの動脈壁の切片の顕微鏡画像に 3 通りのしきい値を適用して画像解析を行い、弾性線維が計測領域サンプル内に占める面積比を計測すると、画像処理 A を 24 ビットカラー画像に適用した場合、中央値は 0.30 (分布範囲 0.27 ~ 0.33)、平均値  $\pm$  SD は  $0.30 \pm 0.01$  であり、グレースケール画像に適用した場合、中央値は 0.25 (分布範囲 0.22 ~ 0.27)、平均値  $\pm$  SD は  $0.25 \pm 0.01$  であった (Table 1)。

画像処理 B を 24 ビットカラー画像に適用した場合、中央値は 0.18 (分布範囲 0.11 ~ 0.31)、平均値  $\pm$  SD は  $0.19 \pm 0.06$  であり、グレースケール画像に適用した場合、中央値 0.25 (分布範囲 0.13 ~ 0.44)、平均値  $\pm$  SD は  $0.25 \pm 0.08$  であった (Table 1)。

画像処理 C を 24 ビットカラー画像に適用した場合、中央値 0.26 (分布範囲 0.11 ~ 0.57)、平均値  $\pm$  SD は  $0.30 \pm 0.13$ 、グレースケール画像に適用した場合、中央値は 0.42 (分布範囲 0.15 ~ 0.65)、平均値  $\pm$  SD は  $0.41 \pm 0.11$  であった (Table 1)。

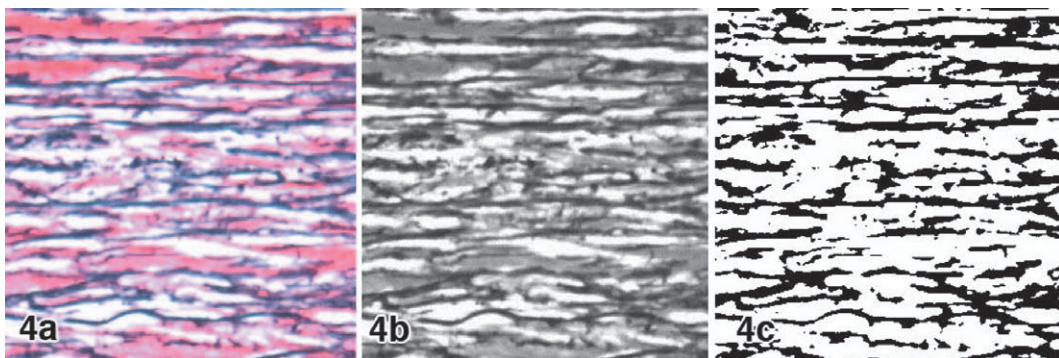


Fig. 4 Demonstration of the threshold technique  
 a: Light microscopic image of EVG stained media of artery photographed by WRAYCAM NF1000 camera.  
 b: Photograph of grayscale image of the same area as Fig. 4a.  
 c: Photograph of threshold image where the black areas are the pixels that were counted as elastic fiber.

Table 1 The area ratio of black pixels counted as elastic fiber in each threshold images

	24-bit Color Image			Grayscale image		
	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD
Processing A (n = 30)	0.30	0.27-0.33	0.30 ± 0.02	0.25	0.22-0.27	0.25 ± 0.01
Processing B (n = 30)	0.18	0.11-0.31	0.19 ± 0.06	0.25	0.13-0.44	0.25 ± 0.08
Processing C (n = 30)	0.26	0.11-0.57	0.30 ± 0.13	0.42	0.15-0.65	0.41 ± 0.11

Area ratio of elastic fiber in tunica media of arterial wall was calculated 30 times each, after three different image processing, A, B, and C were applied to 24bit color and grayscale images.

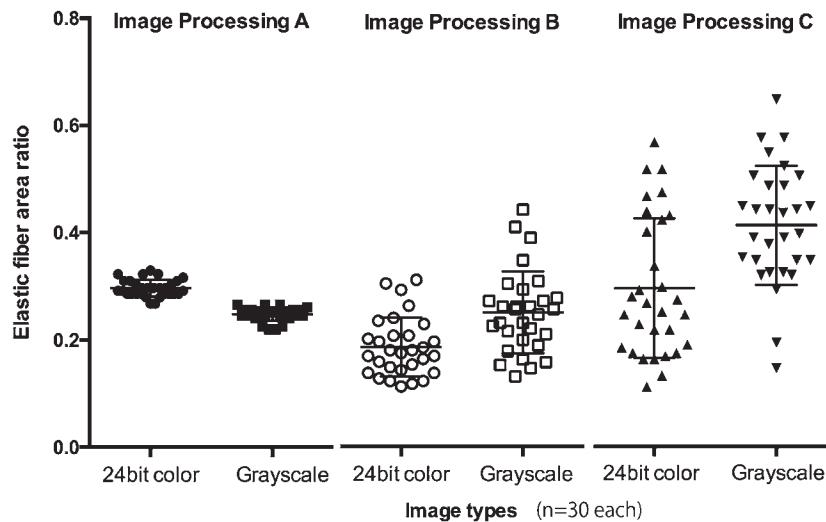


Fig. 5 Graphic representation of the elastic fiber ratio  
Area ratio of elastic fiber in tunica media of arterial wall was calculated 30 times each, after three different image processing, A, B, and C were applied to 24bit color and grayscale images.

3つの画像処理を比較すると処理Aは他の2つの処理に比べて24ビットカラー画像、グレースケール画像いずれにおいてもデータのばらつきが小さい傾向が認められた。また、24ビットカラー画像とグレースケール画像に画像処理を適用した場合、画像処理Aでは24ビットカラー画像から得られたデータがグレースケール画像のそれよりも高い値を示した。他の2つの処理では処理Aとは逆にグレースケール画像から得られたデータが24ビットカラー画像のそれよりも高い値を示した (Fig. 5)。

考 察

弾性線維に限らず画像から組織内に存在する特定の構造物を定量的に計測する場合、まず、その構造物が周囲の組織と画像上で明確に区別できることが

最も重要である。そのような画像を得るための前提条件として、組織切片の厚さ、組織染色、顕微鏡撮影における条件が良好であることが求められる。

このうち組織切片の厚さについては今回、厚みを5µmに統一した。薄切の厚みは画像の色調、特に濃度に大きく影響をおよぼすことが考えられ、画像解析による定量化のためには、切片の厚さは常に統一されている必要がある。なお、画像処理における最適な切片の厚さも考慮する必要があり、それに関する報告はあるが<sup>11)</sup>、最適な切片の厚さを光学的な条件に基づいて検討したのではなく、画像処理における最適な切片の厚さは分かっていない。むしろ今回のような画像からの定量的な計測においては、切片が同じ厚さという同一条件が優先されるべきであろう。

染色に関しては、今回 Elastica van Gieson (EVG) 染色の前田変法を用いた。EVG 染色は弾性線維が黒紫色、膠原線維が赤色、筋線維が黄色に染色され、その他のさまざまな弾性線維の染色法に比べて、弾性線維が周囲の組織と画像上で明確に区別でき、画像上での定量的計測に最適な方法であることが確認された。また、特に前田変法は EVG 染色の原法に比べて弾性線維がより黒く染色されるとされており<sup>13)</sup>、画像における弾性線維の識別に際しては、さらに有利であると考えられる。参考であるが、肺動脈中膜を対象とした報告では、Elastica-Goldner 染色の各成分が免疫組織染色での弾性線維、平滑筋線維、膠原線維をそれぞれ表すことが示されている<sup>14)</sup>。

顕微鏡撮影においては顕微鏡に標準的に使用されているケーラー照明を用い、適切な顕微鏡像を得て、それをデジタルカメラで撮影した。ケーラー照明は顕微鏡光源の像を開口絞り位置につくり、視野絞りの像を標本面につくる照明法のことである。この照明方法は切片を斑なく明るく照明することが可能な上に、視野絞りと開口絞りが独立して機能し、切片上の光の量やその範囲を調整することができるため<sup>15)</sup>、定量的計測に使用するために最適な顕微鏡像が得られると考えられる。

撮影画像のフォーマットは JPEG を用いた。デジタル画像フォーマットについては JPEG の他にも Tagged Image File Format (TIFF) などさまざまな規格が存在するが、JPEG フォーマットはこの中でも ISO 10918-1/ITU-TT.81 で定義されるものでフルカラー画像の記録において標準的に利用されている。また、画像のハンドリングの点においても圧縮画像であるためファイルサイズが TIFF に比べて小さいので、コンピューター上での画像処理時の速度も早くなる。これらの利点から本研究の目的の合致した画像フォーマットであると考えられる。

組織を定量化する場合、これまで論じてきたような前提条件よりも本質的で重要な問題は、定量的計測の対象となる構造物を周囲の組織とデジタル画像上で正確に区別し、それを実際の画像上で抽出するためのしきい値をどのように決定するかということである。

今回、3通りのしきい値の決定法を設定し、それらをデジタル画像に適用して、2階調化のち、弾

性線維の面積比を算定したところ、画像処理 A が最もデータのばらつきが小さく、それに比べ、画像処理 B、画像処理 C はデータのばらつきが非常に大きいことが明らかになった (Fig. 5)。このばらつきの差は主にしきい値を決定する際に輝度値を参照するピクセル数の差に依存していると考えられる。すなわち画像処理 A においては計測領域サンプルの全体である 91809 ピクセル ( $303 \times 303$  ピクセル =  $0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$ ) のほぼすべての弾性線維の輝度値を参照し、しきい値を決定しているのに対して、画像処理 B は任意の 100 ピクセル、画像処理 C も最小では任意の 10 ピクセル、最大でも任意の 20 ピクセルのみの輝度値を参照にしているにすぎず、計測領域サンプルの全体のしきい値を決定するために参照するピクセル数としては非常に少なく、正確なしきい値の決定には不十分であったと思われる。さらに、組織切片は  $5 \mu\text{m}$  と薄いものの厚みを持っているために、切片上で厚さ方向に弾性線維が重なって存在する状態や逆に重なりが少ない状態で存在するなど部位によってさまざまな状況になっていることが想定される。この場合、弾性線維に染色の濃度が部位によって異なっている可能性があり、参照しているピクセル数が少ないと偶然、染色の濃度の濃い部位、あるいは反対に薄いところを参照値としてしきい値を決定する可能性が高くなり、正確なしきい値を得ることはできない。このため画像処理 B、C では弾性線維の面積比のデータはばらつきが大きくなったと推定される。

また、24ビットカラー画像とグレースケール画像に同じ画像処理を適用した場合、画像処理 A では 24ビットカラー画像から得られたデータがグレースケール画像からのデータに比べ高い値を示し、他の2つの処理では処理 A とは逆の傾向を示した。この傾向を示す理由は不明であるが、画像処理 B、画像処理 C は先ほど述べたとおり、しきい値を決定するために参照するピクセル数が非常に少なく、不十分であるため、適切なしきい値が得られず、2種類の画像から得られる弾性線維のデータに誤差を生じさせている可能性があるかもしれない。

これまで動脈の中膜に存在する弾性線維に関しては、Wilkinson の定性的評価を行った報告<sup>7)</sup>、Janzenらの光学顕微鏡下で一視野あたりの本数を用いた分類<sup>8)</sup>、電子顕微鏡を用いた動脈の構造に関する報



告<sup>9-10)</sup>などがあつたが、計測にかかる費用や、計測の精度に関わる切片の厚さに関して言及されたことがなかつた。今回の結果から市販の画像処理ソフトウェアである Adobe Photoshop<sup>®</sup> や光学撮影機材を用いて画像解析システムを構築し、弾性線維の面積比率を簡便に定量化する手法が確立された。定量化において本質的で最重要な問題であるしきい値を決定する方法は「画像の計測領域サンプル内のしきい値を動かし、画像内の弾性線維だけが抽出される輝度値を調べ、それをしきい値とする」方法が最適であると考えられた。

今後、この手法を用いて動脈の連続切片を対象とした中膜に存在する弾性線維の部位別の定量的計測を行うことが可能になり、さらに、脳卒中の原因であるアテロームプラークの形成と血管の組織学的特徴との関連性など脳血管疾患の発生と血管の組織学的特徴の関係を明らかにするための有効なツールになると考えられる。

#### 利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) 水谷 徹. 図と表で理解する脳血管病理の鑑別診断 弾性動脈と筋性動脈. 脳外速報. 2009;19:162-163.
- 2) 後藤 昇, 江連博光. 血管の構造と病理 全身の血管解剖とその組織構造. 水谷 徹, 小島英明編. 動脈瘤と動脈解離の最前線. 東京: 医歯薬出版; 2001. pp3-12. (別冊医学のあゆみ).
- 3) 水谷 徹. 図と表で理解する脳血管病理の鑑別診断 頸動脈. 脳外速報. 2009;19:286-287.
- 4) 堀恵美子, 林 央周, 増岡 徹, ほか. 頸動脈アテロームプラークの伸展度と血管壁の性状に関する検討. 脳卒中の外. 2005;33:35-38.
- 5) 増岡 徹, 林 央周, 堀恵美子, ほか. 頭蓋内外内頸動脈の血管構造に関する検討. 脳卒中の外. 2007;35:30-33.
- 6) Masuoka T, Hayashi N, Hori E, *et al.* Distribution of internal elastic lamina and external elastic lamina in the internal carotid artery: possible relationship with atherosclerosis. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2010;50:179-182.
- 7) Wilkinson IM. The vertebral artery. Extracranial and intracranial structure. *Arch Neurol*. 1972;27:392-396.
- 8) Janzen J, Lanzer P, Rothenberger-Janzen K, *et al.* Variable extension of the transitional zone in the medial structure of carotid artery tripod. *Vasa*. 2001;30:101-106.
- 9) 中島 豊. 大動脈解離の病理. 脈管学. 2003;43:725-731.
- 10) 諏訪喜一. 動脈壁の弾性成分の構造の光顕的—と電顕的検査及びその構造の機能的形成機序について. 岡山医会誌. 1976;88:505-513.
- 11) Flotte TJ, Seddon JM, Zhang YQ, *et al.* A computerized image analysis method for measuring elastic tissue. *J Invest Dermatol*. 1989;93:358-362.
- 12) 前田 明. 病理検査 結合組織の染色 弾性線維の染色 ワイゲルトのレゾルシンフクシン染色 (付 EVG). 医歯薬出版編. 新染色法のすべて. 東京: 医歯薬出版; 1999. pp15-17. (Medical Technology 別冊).
- 13) 渡辺明郎. EVG 染色のメカニズム. 第 87 回日本病理組織技術学会例会抄録. 2012 年 3 月 10 日. (2016 年 8 月 22 日アクセス) [http://www.sasappa.co.jp/jsht/wp-content/uploads/2012/12/EVG\\_130310-SFJwatanabe.pdf](http://www.sasappa.co.jp/jsht/wp-content/uploads/2012/12/EVG_130310-SFJwatanabe.pdf)
- 14) 宇月美和, 岩崎真弓, 伊藤吉賢, ほか. 画像解析による肺動脈幹中膜の加齢学的変化. 脈管学. 2003;43:659-666.
- 15) ニコンマイクロスコープ・ソリューション事業部, ニコン産業機器事業部, ニコンインテック. 顕微鏡の照明法. (2016 年 8 月 22 日アクセス) <http://www.nikon-instruments.jp/jpn/learn-know/microscope-abc/microscope-lighting/index.html>

MICROSCOPIC QUANTIFICATION OF ELASTIC FIBER IN TUNICA MEDIA  
OF THE HUMAN ARTERY USING PHOTOSHOP

Yu KATO, Tohru MIZUTANI, Kazuki IIZUKA,  
Minako KUBO and Yu SAKAMOTO

Department of Neurosurgery, Showa University School of Medicine

Naruhito OTSUKA, Hiromitsu EZURE and Yuriko INOUE

Department of Anatomy, Showa University School of Medicine

**Abstract** — Some researchers have reported the amount of elastic fiber in the tunica media of arterial wall according to the actual number of fibers counted on the microscopic field. However, no study has measured the precise quantity of elastic fibers using general equipment. The purpose of this study was to establish a method for measuring the quantity of elastic fibers in the arterial wall by using a simple technique employing affordable consumer software. The common carotid artery was cut into 5  $\mu\text{m}$  thick cross sections and stained using the Elastica van Gieson method, as modified by Maeda. Image was taken with a digital camera connected to a computer; 24-Bit color and 8-Bit grayscale images were created and three different image processing methods were applied. The pixels containing elastic fiber were identified and measured using Photoshop. The area fractions were determined by counting the positive and total pixels (threshold). Among the three different processes applied, the variance and standard deviation of the elastic fiber ratio was extremely small; it was thought to be the optimum when the desired threshold image was selected by moving the threshold arbitrarily with the reference of the original image to extract only the elastic fibers. We have developed a method for quantifying the area fraction of elastic fibers in the tunica media of the arterial wall. This method provides a research tool for studies in the distribution of elastic fibers in specific locations of the carotid artery.

**Key words:** carotid artery, tunica media, elastic fiber, image processing, Adobe Photoshop®

[受付：8月25日，受理：9月20日，2016]