

無染色肝病理組織標本の画像解析 Analysis of unstained hepatic histological sections

牛川 卓弥[†] 高橋 正信[†] 中野 雅行[‡]
Takuya Ushikawa Masanobu Takahashi Masayuki Nakano

1. 背景

病理組織診断とは、スライスした生体組織を染色し、顕微鏡で観察することで癌をはじめとした疾病を診断する方法である。生体組織を直接的に観察し、診断を行うため信頼性は高いが、病理医の裁量に任せられており、経験や体調が診断結果に影響を及ぼす恐れがある。そこで画像解析を用いることで客観的指標を提示し、診断を補佐する研究が行われている。

病理組織診断および画像解析では、通常は HE 染色を施した標本が利用される。しかし、施設の違いや染色条件によって染色の度合いが異なったり、染色ムラや退色の問題などがある。そこで、本研究では、染色していない標本（無染色標本）の利用について検討する。無染色標本では染色度合いの違いや退色などの問題が本質的に発生しない。また、図1に示すとおり、染色過程も不要となる。さらに、組織への染色の影響が無いため、染色標本では得られない情報が得られる可能性もある。

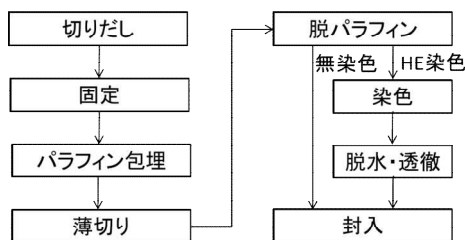


図1 病理組織標本作製手順

2. 目的

無染色標本の画像解析を目的とするが、病理組織診断で通常利用される明視野観察では、無染色標本の視認性は低い。そこで、暗視野、位相差も利用して画像解析を行う。具体的な解析機能としては、これまで HE 染色標本に対して実現している核位置の抽出機能[1],[2]と細胞膜の抽出機能[3]を無染色標本に対して実現する。

3. 撮像方法

3.1 明視野

病理診断で通常利用される撮影法である。試料を均一に照らし、試料の各部分における光の吸収率の違いによって透過光の像にコントラストが付くことを利用して撮影する。

3.2 暗視野

暗視野コンデンサにより明視野の光を遮蔽し、試料へ斜めから光を当てて散乱光や反射光を撮影する。対物レ

ンズに直接光が入らないため視野は暗くなる。

3.3 位相差

屈折率差によって生じる光線の位相差を、コントラストに変換する。

3.4 無染色標本の撮影

40 倍の対物レンズ(NA0.75)を用い、肝病理組織標本を明視野、暗視野、位相差で撮影した。HE 染色標本を撮影した画像例を図2に、無染色標本を撮影した画像例を図3に示す。HE 染色標本に対しては一般的に明視野が使用される。しかし、無染色標本は無色透明なため、明視野では図3(a)に示すようにコントラストがかなり低くなり、観察に適さない。そこで、顕微鏡の開口絞りを絞り、NA を小さくして撮影したところ、解像度は劣化するものの、コントラストは向上することがわかった。NA を下げた場合の明視野画像例を図4に示す。

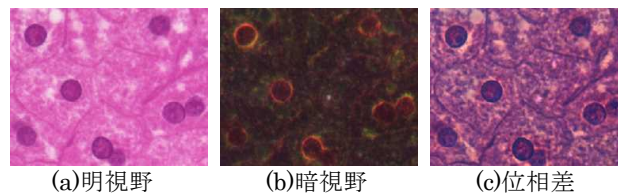


図2 HE染色標本の撮影画像

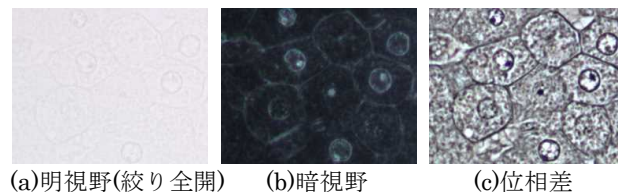


図3 無染色標本の撮影画像

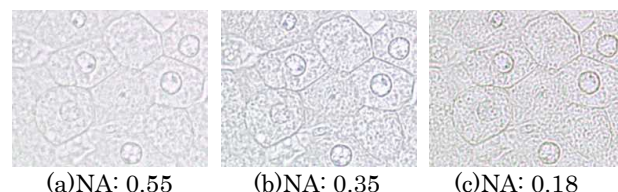


図4 NAを下げた場合の無染色標本の明視野画像

4. 細胞膜抽出

4.1 方法

HE 染色標本の細胞膜は複数の撮像法による画像の色情報を組み合わせることにより抽出できる[3]。そこで、同じ手法により無染色標本画像中の細胞膜の抽出を試みた。具体的には、予め作成した正解画像からランダムにサンプリングした画素の色情報を元に教師データを作成し、識別器を学習して識別を行った。なお、識別器には HE 染色標本の場合に SVM よりも正解率が高く識別時間も短かった階層型ニューラルネットワークを用いた。

[†] 芝浦工業大学, Shibaura Institute of Technology

[‡] 湘南藤沢徳洲会病院,

Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital

4.2 実験

実験には無染色標本画像 (500×500 画素) を 5 枚用いた。教師データとして用いる色情報は色と色度とし、1つの撮像法あたり 6 次元とした。明視野、暗視野、位相差の 3 種類の画像の組み合わせ方を変えて正解率を比較した。なお、明視野撮像における NA は実験により 0.55 とした。また、色情報の有用性のみを評価するため、細胞膜抽出後に画像処理は行わずに正解率を評価した。

1つの撮像法の色情報のみを用いた場合、および 3 種類の画像を全て組み合わせる場合の抽出結果例を図 5 に示す。画像において、黒は正しく抽出された細胞膜、赤は誤抽出、シアンは抽出されなかった細胞膜を表す。明視野、暗視野、位相差を単独で使うと、核や細胞質が多く誤抽出されているが、全てを組み合わせることで誤抽出を大幅に減らせることがわかる。表 1 は、各組み合わせについての 5 枚の画像の平均正解率を正解率の高い順に並べたものである。1 種類の画像より 2 種類の画像を組み合わせることで正解率は改善した。さらに、暗視野と位相差を組み合わせる場合[4]よりも、明視野も含めた 3 種類の画像全てを用いることで平均正解率は最高となることがわかった。

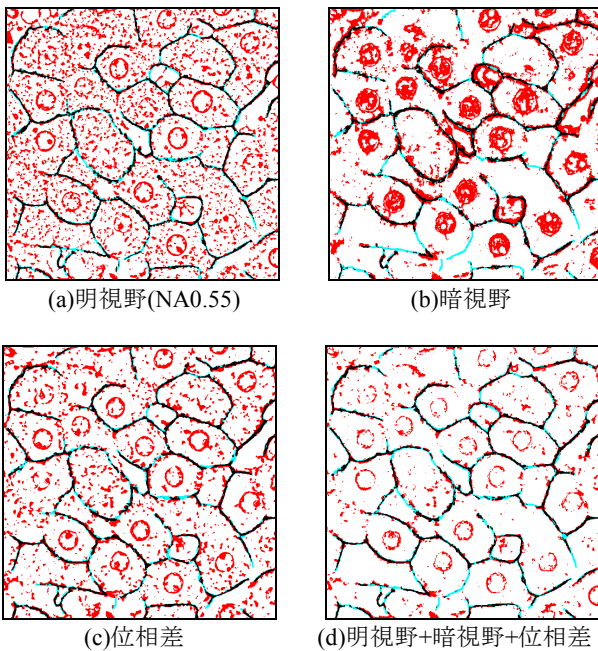


図 5 細胞膜抽出結果例

(黒: 正しく抽出された細胞膜, 赤: 誤抽出, シアン: 抽出されなかった細胞膜)

表 1 色情報のみを用いた細胞膜抽出正解率

抽出正解率			色, 色度		
細胞膜	非細胞膜	平均	明視野	暗視野	位相差
0.880	0.872	0.876	○	○	○
0.864	0.846	0.855	×	○	○
0.854	0.781	0.818	○	○	×
0.805	0.810	0.808	○	×	○
0.826	0.752	0.789	×	○	×
0.793	0.758	0.775	×	×	○
0.727	0.759	0.743	○	×	×

5. 核位置抽出

5.1 方法

HE 染色標本の明視野画像 (図 2(a)) に対する核位置抽出手法[1]は既の実現されている。[1]の手法は核が暗い色であることを利用している。そこで、無染色標本の暗視野画像 (図 3(b)) をネガポジ反転して核が暗い色の画像を作成した上で従来の核位置抽出手法を適用し、核位置抽出を試みた。

5.2 実験

実験には無染色標本 5 枚から各 2 枚ずつ撮影した 10 枚の画像を使用した。評価基準としては、核の総数に対して修正の必要な位置の割合を表す修正率を用い、修正率が最高となるように手法中の諸パラメータを最適化した。正解率、誤抽出率、修正率はそれぞれ以下のように定義される。実験の結果、正解率は 87.6%、誤抽出率は 6.5%、修正率は 18.9%となり、無染色標本においても HE 染色標本と同様に核抽出が可能であった。

$$\text{正解率} = \frac{\text{核を核と判定した数}}{\text{核の総数}}$$

$$\text{誤抽出率} = \frac{\text{非核を核と判定した数}}{\text{核の総数}}$$

$$\text{修正率} = 1 - \text{正解率} + \text{誤抽出率}$$

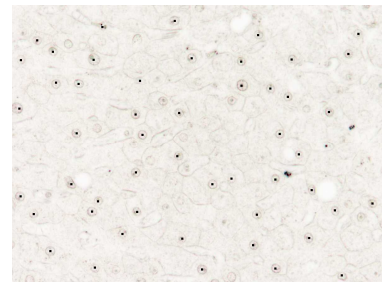


図 6 核位置抽出結果例

6. まとめ

無染色標本の画像解析手法について検討し、明視野、暗視野、位相差の 3 種類の撮像法を利用することで核位置と細胞膜の抽出というこれまで HE 染色標本に対して実現された解析機能を同様に実現できることを示した。得られた精度は、標本は異なるものの HE 染色標本に対して得られていた精度と余り変わらず、無染色標本においても HE 染色標本と同様な画像解析ができる可能性を示している。今後の課題として、抽出精度のさらなる向上、無染色標本ならではの解析手法の検討などが挙げられる。

参考文献

- [1] 谷本, 他: “早期肝細胞癌向け病理診断支援システム”, 信学技報, MI2009-63, pp.41-46, 2009.
- [2] M. Takahashi, et. al.: “Segmentation of Nuclei in Hepatic Histological Images Using Multimodal Method”, EMBEC2011, pp.219-223, 2011.
- [3] N. Matsushita, M. Takahashi, M. Nakano: “Multimodal Method for Cell Membrane Extraction in Hepatic Histological Images”, IEEE EMBEC2010, Buenos Aires, pp.4068-4071, 2010.
- [4] 宮本, 高橋, 中野: “無染色標本の撮像および解析”, 信学会総合大会, D-16-2, 2014.