

## ヘマトキシリン染色された厚い肝組織標本の3次元核位置抽出

## 3-D position detection in hematoxylin-stained thick hepatic histological sections

D-16

高野 将<sup>†</sup>高橋 正信<sup>†</sup>中野 雅行<sup>‡</sup>

Masashi Takano Masanobu Takahashi Masayuki Nakano

<sup>†</sup> 芝浦工業大学<sup>‡</sup> 湘南藤沢徳洲会病院<sup>†</sup> Shibaura Institute of Technology<sup>‡</sup> Shonan Fujisawa Tokushukai Hospital

## 1. 背景

通常の病理組織診断は厚さ数  $\mu\text{m}$  に薄切した病理組織標本の2次元画像を観察して行われる。しかし、形態の異常は3次元空間で生じているものであり、それを2次元観察像から判断しているため、核密度などの特徴量が標本厚さや核の大きさなどに依存する問題がある[1]。

こうした問題は、標本を3次元解析することで改善できる。3次元画像を得る方法としては連続して薄切した多数の標本の2次元画像を積層する方法と共焦点レーザー顕微鏡を用いる方法があるが、前者は非常に手間がかかり、後者は通常の病理診断では利用しない蛍光染色を施す必要があるうえ、一般の病理医が利用するのは難しい。そこで病理医が診断に利用している光学顕微鏡と透明度の高い標本を用いて1枚の厚い標本の3次元画像を取得し、解析する。

## 2. 目的

病理診断に通常用いられる HE 染色のうち核などを染色するヘマトキシリン染色(H 染色)のみを施した厚い標本を用い、光学顕微鏡で3次元画像を取得するとともに、細胞核の3次元位置を抽出することを目的とする。

## 3. 撮像

H 染色を施した厚い肝病理組織標本を作成し、対物レンズのピント位置を変えながら明視野で連続撮影して3次元画像を取得した。標本厚さは通常の約 10 倍( $30\mu\text{m}$ )とした。図 1 に標本上部と下部の画像と断面画像例を示す。厚さが  $30\mu\text{m}$  もあると通常の HE 染色では光の吸収が大きすぎて観察困難であるが、H 染色では上部から下部まで良好に核を観察できることが解った。



図 1 ヘマトキシリン染色標本の撮像例(一部)

(対物レンズ×40, Z 軸ステップ:  $0.25\mu\text{m}$ )

## 4. 核位置抽出手法

核位置抽出法としては2値化やエッジを利用する方法が考えられるが、厚い標本では2つの核が近接して観察される場合があり、両者が一体化して抽出された場合にその分離が必要となる問題がある。

本研究では異型が比較的軽度の早期の肝細胞癌では核が球形(2次元では円形)に近いことを利用した手法を検討した。図 2 に示すように核輪郭部の勾配ベクトルが核の中心方向を向くことを利用し、勾配方向(画素値が低くなる方向)に勾配ベクトルフロー強度(以下、フロー強度)を加算し、積算された強度が高いところを核位置とする。

画像中の強度が一定以上の勾配ベクトルについて、勾配方向の扇形領域内のフロー強度を加算し、積算された強度が高いところを核候補領域として、その領域の重心を核位置とする。

核位置抽出手法の概要を次にまとめる。

- (1) 積算後のフロー強度が一定以上の画素を核候補領域として抽出し、面積一定以上の領域を収縮。
- (2) 重心間距離が一定以下の核候補領域をグルーピング。
- (3) 各(X,Y)座標について、Z 軸方向に連続する領域の中心を核中心候補画素として抽出。
- (4) 同じ核候補領域に属する核中心候補画素の重心を核の3次元位置とする。

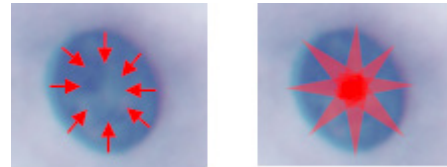


図 2 勾配ベクトルフローを用いた核位置抽出

## 5. 実験

撮像した3次元画像のうち、細胞核が密集し抽出が難しいと思われる箇所について実験を行った。核候補領域と核中心候補画素の例を図 3 に示す。図 3(a)と図 3(b)は厚さ方向に通常の核サイズより離れているため異なる核が観察されるが、それぞれの画像中で核の内部に核候補領域と核中心候補画素が生成された。また、図 3 中に破線で示すような複数の核が一体化して観察される場合も核候補領域は分離しており、本手法が近接・一体化した核の分離に有用であることがわかる。

細胞核の中心位置を目視で決定し、抽出結果を評価した。一つの核に対して抽出結果が一つだけ対応付けられる場合を正しく検出したとみなして評価したところ、この3次元画像に含まれる肝細胞核 60 個のうち 57 個(95%)を正しく検出できた。検出されなかった 3 つの核は何れもエッジ強度が極端に低いものであった。現状では肝細胞以外の核やリンパ球なども抽出されるため、今後はこれらと肝細胞核の判別に取り組みたい。

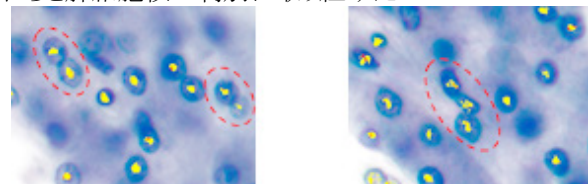
(a)  $Z = Z_0$ (b)  $Z = Z_0 + 8\mu\text{m}$ 

図 3 核候補領域(黄)と核中心候補画素(赤)

[参考文献]

[1] M.Takahashi, et.al., IAP2006, 230, 2006.