

暗視野画像を利用した肝病理組織標本画像からの線維と核位置の抽出

Extraction of fibers and nuclear positions in hepatic histopathologic images using dark field imaging

木谷 拓也[†] 高橋 正信[†] 中野 雅行[‡]
 Takuya Kitani Masanobu Takahashi Masayuki Nakano

1. はじめに

病理組織診断とは、スライスした生体組織を染色し、それを顕微鏡で観察することで癌などの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、一方では病理医の裁量に任せられているため、診断結果が経験や体調により左右されてしまう可能性がある。そこで、画像解析を用いた客観的指標を提示することで、診断を補佐する研究が行われている。

例えば、肝細胞癌を診断する上で有用な特徴量として N/C 比がある。これは以下の式で算出される (図 1)。

$$N/C \text{ 比} = \frac{\text{核面積}}{\text{細胞質面積}} \quad (1)$$

肝細胞の場合、非癌部の N/C 比は平均 7.7% であるのに対し、初期癌では平均 12.3% になる [1]。従来の N/C 比算出方法は図 2 に示すように、ひとつの細胞を選択した上で、細胞の輪郭と核の輪郭を取り、そこから N/C 比を手動で算出していた。この方法では手間がかかる上に、間違っただけの細胞を選択してしまった場合には正しい N/C 比が算出できない問題がある。そこで、画像全体から N/C 比を算出することを考えた。

肝病理組織標本画像は、主に核と細胞質を含んだ「細胞領域」と肝細胞に接する血液が流れる「類洞領域」から成る。そのため、画像全体から「類洞領域」を差し引くことで細胞質と核領域が求まる。細胞領域と類洞領域の間には線維領域が存在しているため、線維を抽出し、それを利用して細胞領域と類洞領域を容易に区別することができる。また、同じ画像中の核面積を求めるには核の位置を抽出する必要がある。

そこで、N/C 比算出を最終目的として、まずは同じ標本画像から線維と核位置を抽出する手法について検討した。

$$N/C \text{ 比} = \frac{\text{核}}{\text{細胞質}}$$

図 1 N/C 比



図 2 従来の算出方法

2. 使用する画像

2.1 染色法

肝病理組織の診断に際しては、主に HE 染色と鍍銀染色が用いられる。HE 染色は核の抽出には適しているが、線維は染色されない。一方、鍍銀染色は線維抽出に適しているが、核の抽出は容易ではない。そこで、同じ標本画像から線維と核を抽出するため、新たに両方の染色 (鍍銀 HE 染色) を施した標本を作成して用いた (図 3)。



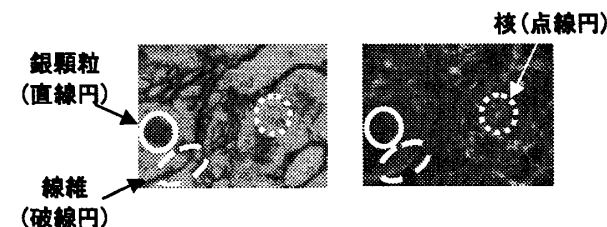
(a) H.E 染色 (b) 鍍銀染色 (c) 鍍銀 HE 染色

図 3 染色方法

2.2 撮影方法

病理組織標本を観察する場合は、標本の裏面から照射され透過した光を観察する明視野観察が一般に用いられる。光学顕微鏡では、明視野以外にも、暗視野や位相差といった観察法が可能であるが、病理医による観察に利用されることはほとんど無い。しかし、それらの観察法による画像は明視野だけでは得られない情報を含んでおり、それらを利用することで、従来の明視野画像だけでは実現できなかった機能を実現できる可能性がある。また、これらの観察法間の切替えはコンデンサを回転するだけで容易にできるため、病理医の負担が増えることもほとんど無い。

肝病理組織標本の鍍銀 HE 染色標本を明視野および暗視野で撮影した画像例を図 4 に示す。明視野 (図 4(a)) では、線維の画素値は低く、銀顆粒と思われるもや状に暗い領域 (「銀顆粒」と呼ぶ) の画素値も低い。一方、核の画素値はそれらに比べて高い。一方、暗視野 (図 4(b)) では、銀顆粒の画素値は明視野と同様に低いものの、線維と核の画素値がやや高い。こうした違いを利用することにより、線維と核位置の抽出を試みる。



(a) 明視野 (b) 暗視野

図 4 鍍銀 HE 染色標本の撮影画像

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

[‡] 東京女子医科大学八千代医療センター,

Tokyo women's medical university yachiyo medical center

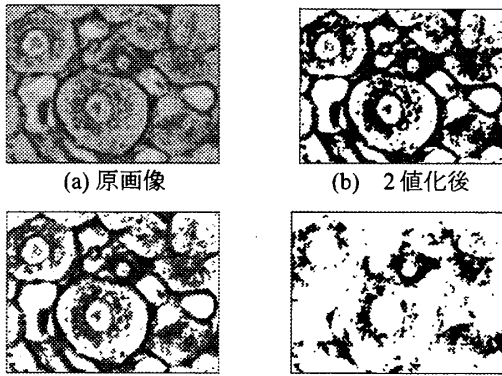
3. 手法

3.1 線維抽出手法

線維は明視野画像のうち、暗い部分の領域として抽出できるが、鍍銀 HE 染色標本画像では「銀顆粒」と思われる暗い領域が存在する(図 4(a))。この領域と線維の画素値が近いため、例えば閾値処理で2値化すると、図 5(b)に示すように線維だけでなく、銀顆粒も抽出されてしまい、線維だけの抽出が困難となる。一方、暗視野画像(図 4(b))では、銀顆粒領域は暗いままだが、線維は少し明るい。そこで、この差を利用して銀顆粒領域だけを抽出して削除する。

3.1.1 銀顆粒領域抽出

2 値化後の暗い方の領域数が最大となる閾値で、明視野画像を2値化する(図 5(b))。これにより、線維領域と銀顆粒領域が併せて抽出される。次に、暗視野画像で線維と銀顆粒の R の値に差があることを利用し、図 5(b)をマスク画像として明視野と暗視野の R の平均画像(図 5(c))を作成し、濃淡ヒストグラムが最大となる画素値を閾値として2値化する。これにより、暗い方の領域として銀顆粒領域が抽出される(図 5(d))。

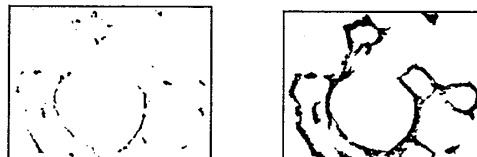


(a) 原画像 (b) 2 値化後
(c) 明視野 R と暗視野 R の平均 (d) 銀顆粒領域

図5 銀顆粒領域抽出

3.1.2 線維抽出

明視野画像から銀顆粒領域を削除した画像から線維を抽出するが、銀顆粒以外にも核の輪郭や細胞膜の一部が暗く染まっており、単純な2値化では線維との識別が難しい。一方、それら線維に紛らわしい領域は暗いものの、領域中の最も暗い画素値を比較すると、線維よりも高いことがわかった。そこで、線維に紛らわしい領域が抽出されない閾値で2値化した画像(図 6(a))を作成した。これを線維のシード(種)として、閾値を上げながらシードに隣接する領域のみを追加していき、線維のみを抽出した(図 6(b))。



(a) 線維のシード(種) (b) 線維抽出結果

図6 線維抽出

3.2 核位置抽出手法

核位置の抽出には、核が明るく映る暗視野画像(図 7)を利用した。暗視野の R 画像を2値化した画像から、線維領域と銀顆粒領域を削除する。結果画像をオープニングして小領域を削除した後、平滑化、2 値化し、各領域の重心位置を核位置として抽出する。結果例を図 8 に示す。

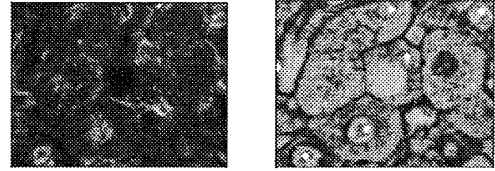


図7 暗視野画像

図8 核位置抽出結果

4. 精度評価

4.1 線維抽出結果

標本作成条件などの変化の影響を軽減するため、実験には撮影した画像をイコライズしたものを用いた。パラメータのうち、閾値を上げる上限の値のみを各画像で最適化することとし、その他のパラメータは固定とした。9 枚の画像を用いて評価した結果、69.0 %の線維が正しく抽出され、線維総面積の 19.2%が誤って抽出された。

正解率が低いように思われるが、これは線維の周囲にグラデーションがあるため、正解画像を作成する際に何処までを線維と判断するかが困難なことに起因する(図 9, 図 10)。類洞と細胞質の識別を目的と考えると、線維の太さ(面積)は重要ではなく、類洞の周囲を囲むように抽出されていることの方が重要である。現在、そうした観点での評価基準を検討中である。

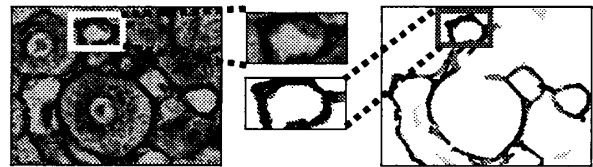


図9 明視野画像

図10 線維抽出結果

4.2 核位置抽出結果

核のうち、銀顆粒が重畳しているものは銀顆粒と共に削除されるため、抽出が困難である。そこで、銀顆粒が重畳している割合が面積の 3 割程度以下のもののみを用いて評価を行った。抽出に際しては、最後の2値化の閾値のみ画像ごとに最適化することとし、その他のパラメータは固定とした。5 枚の画像を用いて評価した結果、核総数の 80.0%が正しく抽出され、核総数の 30.4%に相当する位置が誤って核として抽出された。

5. おわりに

鍍銀 HE 染色標本を用い、暗視野画像を併用することで、同じ標本画像からの線維と核位置の抽出を実現した。精度の更なる改善と、N/C 比の算出が今後の課題である。

参考文献

[1] 中野雅行, “高分化型肝細胞癌の画像解析による組織診断—核の円形度の有用性について—”, 肝臓, 31(3), p318-323 (1990).