

肝病理組織標本の3次元核密度推定—精度の改善—

Estimation of 3-D nuclear density of hepatic histopathological specimen -Improvement of accuracy-

吉見 崇† Takashi Yoshimi 高橋 正信† Masanobu Takahashi 中野 雅行‡ Masayuki Nakano

1. はじめに

病理組織診断は病巣組織を顕微鏡で観察する診断手法であり、癌などの病気を診断する最も正確な診断手法とされている。病理組織診断は専門の医者(病理医)により行われるが、日本の病理医の数は少なく、病院によっては専門外の外科医などが病理診断を行う事態となっている。我々は、診断精度の向上を目的として、診断に有用な情報を画像解析により提示する診断支援システムの実現を目指しており、これまで非癌部との鑑別が特に困難な初期の肝細胞癌の病理組織診断を支援するシステムを構築した[1]。これは、初期の肝細胞癌の核密度(単位面積あたりの核の数)が非癌部よりも高いことを利用し[1][2]、核密度を半自動的に算出することにより診断を支援するものである。しかし、核密度の算出に使用する画像は組織を厚さ数 μm に薄切した標本の断面画像であるため、図1に示されるように標本の厚さなどが異なると観察される(2次元)核密度も変化する問題があった[3]。これは、本来は3次元であるべき核密度(単位体積あたりの個数)ではなく、2次元核密度を指標として用いていることによる。この問題は3次元核密度を算出することにより解決されるが、我々の調べた限りそうした手法に関する報告は無かった。

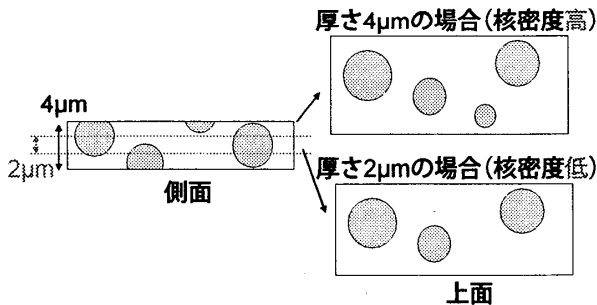


図1 標本厚さの違いによる核密度の変化

本研究の最終目標は病理組織標本の3次元核密度を求める手法を実現し、利用者が簡便に利用できるシステムを実現することである。方法としては、病理医が通常診断業務に利用する1枚の病理組織画像を用いる手法について検討した。カメラ以外には自動ステージなどの特別な設備を必要としないため、多くの施設において利用できる利点がある。

前回の報告[4]では、推定方法の原理を報告し、実験により3次元核密度が推定可能なことを示した。しかし、90%信頼区間の幅が推定値に対して35%程度(対物レンズ40倍の場合)と比較的広く、病理医が鑑別診断に利用する

ためには推定精度を向上する必要があった。そこで、信頼区間の幅をより狭くすることを目的とし、推定に利用する特徴量の改善を試みた。その結果、例えば対物レンズ10倍相当の視野の画像を用いた場合で信頼区間の幅を従来の約半分の12%程度に向上できることが明らかとなった。また、視野の広さと信頼区間の幅の関係についても明らかにしたので報告する。

2. 3次元核密度の推定手法

病理医が観察に用いている顕微鏡画像は標本の断面画像、即ち2次元情報であり、その情報だけから3次元核密度という高次元の情報を一意に決定することは本質的に困難である。そこで、ベイズ推定により2次元情報を観測値として3次元核密度の出現する確率密度を推定する。

$$P(\Theta | X_o) = \frac{P(\Theta)P(X_o | \Theta)}{P(X_o)} \quad (1)$$

ここで、 X_o は推定に使用する特徴量(観測値)であり、核に関する特徴量を実画像から算出して用いる。 Θ は推定すべき核に関するパラメータであり、核のサイズが正規分布すると仮定して、3次元核密度 d_{3D} 、核の平均半径 r 、核の半径の分散 σ^2 の3次元とした。式(1)の右辺の各項を求めることにより、 X_o が観測された時のパラメータの出現する確率密度 $P(\Theta | X_o)$ を求めることができる。

右辺のうち、 $P(\Theta)$ は、パラメータ Θ の出現する確率密度(事前確率密度)であり、現時点では不明であるためパラメータ空間で一様とする。

$P(X_o | \Theta)$ は、予め設定したパラメータの範囲内においてパラメータ Θ の値を変えながら以下の処理(1)~(3)を繰り返して、算出する。

(1)パラメータ Θ をある値に設定し、乱数を用いて肝組織内の核分布の仮想的なモデルを生成する。

(2)仮想的な核分布モデルを仮想的に薄切し、その断面より特徴量を算出する。なお、薄切する厚さは推定対象とする標本と同じ(既知)とし、焦点深度は標本の厚さよりも深いものとする。

(3)算出した特徴量が観測値 X_o と一致するかどうかを判定し、一致する頻度を求めることで設定したパラメータに対する $P(X_o | \Theta)$ を算出する。

最終的には、 $P(\Theta | X_o)$ を3次元核密度以外のパラメータ(核の半径の平均、分散)について積分することにより、3次元核密度の出現する確率密度 $P(d_{3D} | X_o)$ が求まる。

3. シミュレーション

3.1 特徴量の改善(ヒストグラムの利用)

前回の報告[4]では、推定に利用する特徴量として、2次元核密度、核の面積の平均、分散を用いた。今回は新たに、核の面積の分布についてより詳細な情報を持つと考えられる核の面積のヒストグラムを特徴量として用いた。本

† 芝浦工業大学

‡ 国立病院機構千葉医療センター

章では、シミュレーションにより両特徴量を比較した結果について述べる。

シミュレーションには、表1に示すパラメータを持つ仮想的な組織を想定し、厚さ 3.00 μm に薄切した標本を倍率 10 倍の対物レンズを用いて撮像した場合の仮想的な画像を用いた。表1のパラメータは、後述する実画像を用いた実験結果を基に決定した。この仮想的画像から算出した核の面積のヒストグラムを図2に示す。ヒストグラムの階級値は、信頼区間の幅が最も狭くなるように最適化した値 (25 μm^2) を用いている。

図2のヒストグラムを観測値 X_0 として用い、2章に記述した手法で3次元核密度を推定した。なお、推定時にはパラメータの範囲と分解能を表2に示す値に設定した。また、推定には仮想的に算出した特徴量が観測値 X_0 と一致するかどうかを判定する必要があるが、その基準として今回はヒストグラムの頻度の差が全ての階級で ± 32 以下の場合(2次元核密度に換算して $\pm 28.3/\text{mm}^2$ 以下)を一致と判定することとした。この範囲を狭めても最終結果の信頼区間の幅はほとんど変わらなかったため、計算時間短縮のためにこの値とした。

3次元核密度の推定結果を従来の特徴量を用いた場合の結果と共に図3に示す。また、90%信頼区間の幅と90%信頼区間の幅を確率密度が最大となる値で割った値(規格化90%信頼区間幅と呼ぶ)を表3に示す。規格化90%信頼区間幅(幅の半分が想定される誤差の割合に相当)は、従来の特徴量を用いた場合20%であったが、ヒストグラムを特徴量として用いることで11%と従来の約半分に改善された。即ち、3次元核密度の推定精度を向上する上で、核の面積のヒストグラムは従来の特徴量よりも有効であるといえる。

図4と図5はそれぞれ核の平均半径と分散に関する推定結果である。図3~図5において、確率密度が最も高くなる値は、それぞれシミュレーションのための仮想的な組織を生成する際に設定したパラメータ(表1)と一致する。このことは、これらの推定結果の妥当性を示すものと考えられる。

表1 シミュレーションに用いた仮想的組織のパラメータ

3次元核密度	12.5 $\times 10^4$ (/mm ³)
核の平均半径	3.50(μm)
核の半径の分散	0.00(μm^2)

表2 推定時のパラメータの範囲と分解能

	下限	上限	分解能
3次元核密度 (/mm ³)	6 $\times 10^4$	17 $\times 10^4$	0.5 $\times 10^4$
核の平均半径 (μm)	3.00	4.00	0.05
核の半径の分散 (μm^2)	0.00	0.50	0.05

表3 3次元核密度の推定結果

	90%信頼区間幅	規格化90%信頼区間幅
従来	2.54 $\times 10^4$ (/mm ³)	20.3 (%)
本研究	1.38 $\times 10^4$ (/mm ³)	11.0 (%)

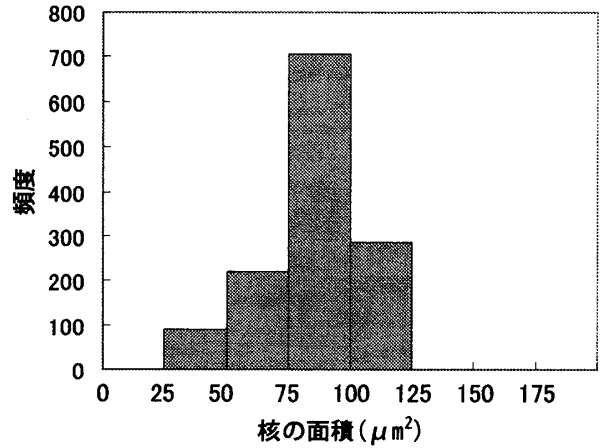


図2 核の面積のヒストグラム

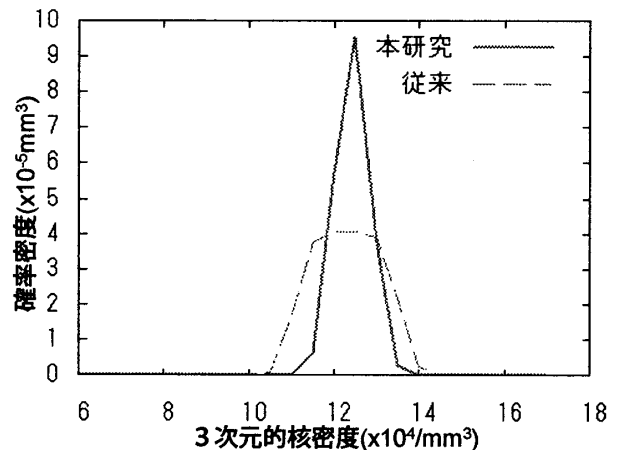


図3 3次元核密度の推定結果

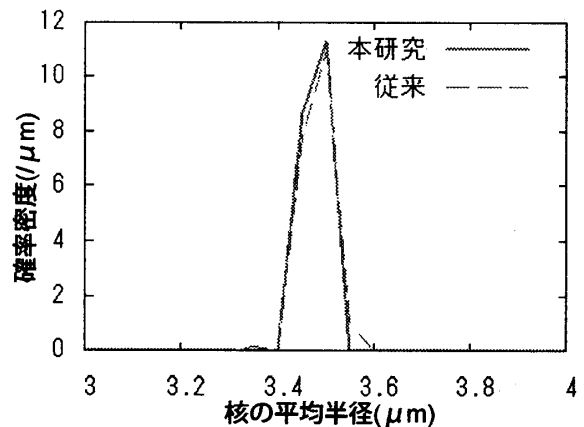


図4 核の平均半径の推定結果

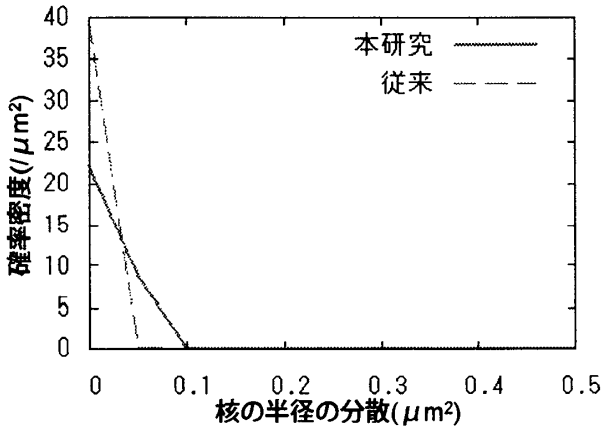


図5 核の半径の分散の推定結果

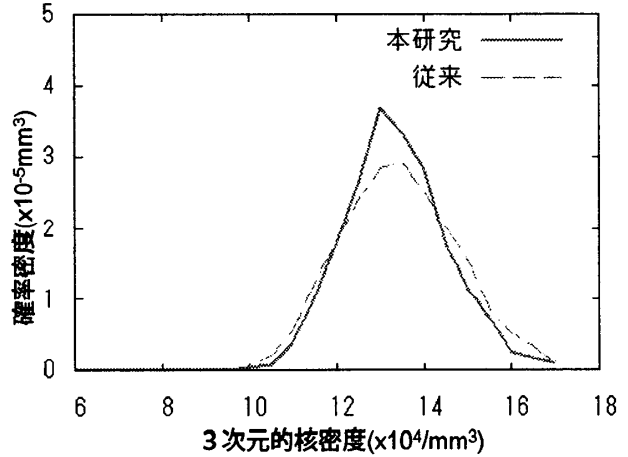


図6 視野サイズが40倍の対物レンズに相当する場合の3次元核密度推定結果

3.2 視野サイズと信頼区間幅 (推定精度) の関係

3次元核密度の推定には画像中の核の領域から算出される特徴量を用いるが、その際に用いる画像の標本上での面積(視野サイズと呼ぶ)が大きいほど信頼区間幅は狭まり推定精度が向上すると考えられる。そこで、視野サイズと90%信頼区間幅の関係をシミュレーションにより調べた。シミュレーションに用いたパラメータや諸条件は視野サイズを除いて前節(3.1)と同じとした。視野サイズとしては、対物レンズの倍率が10倍($7.1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)、20倍($28 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)、40倍($113 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)に相当する場合について調べた。

図6は視野サイズが40倍の対物レンズに相当する場合の3次元核密度の推定結果である。対物レンズ10倍の場合の結果(図3,表3)と比較して90%信頼区間の幅が広がっていることが解る。20倍の対物レンズの場合にも同様にして90%信頼区間の幅を求め、確率密度が最大となる値で割って規格化した値(規格化90%信頼区間幅)を縦軸としてグラフ化した結果を図7に示す。なお、区間幅の値は倍率40倍については10回、他の倍率については3回の結果の平均値である。図7を元に考察した結果を以下にまとめる。

- (1)特徴量として核の面積のヒストグラムを用いることは視野サイズによらず精度改善に有効である。また、ヒストグラムを用いることにより信頼区間幅を狭める効果は視野サイズが大きい(対物レンズの倍率が低い)ほど大きい。
- (2)視野サイズが大きいほど信頼区間幅は狭くなる。一般に標本データから平均値などを推定する場合の信頼区間幅は推定に用いるデータ数の1/2乗に反比例して減少するため、3次元核密度推定時の信頼区間幅も視野サイズの1/2乗に反比例して減少すると予想していた。しかし、図7におけるグラフの傾きは予想される-1/2よりは小さくなっている。この差は手法の改善の余地を示しており、特徴量を含む手法を改善することにより傾きが-1/2に近づくものと考えている。図7より、ヒストグラムを用いた場合の方が傾きが-1/2に近く、その点からもより有効な特徴量であることを示していると考えられる。

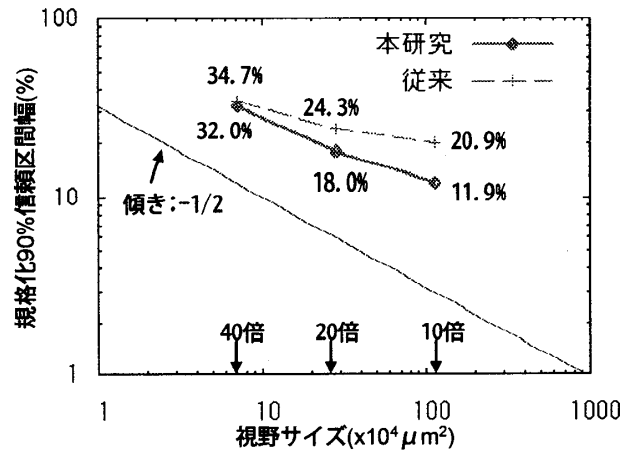


図7 視野サイズと規格化90%信頼区間幅

4. 実験

特徴量として核の面積のヒストグラムを用いることの有効性を確認するため、実験を行った。実験に用いた画像は肝病理組織標本(H.E.染色,厚さ $3\mu\text{m}$)を撮影したものである。今回は、撮像した画像から核の領域を手作業で抽出し、核領域からの特徴量の算出はプログラムにより自動的に行った。核領域抽出作業が自動化されていないため、今回の実験は視野サイズが比較的狭い40倍の対物レンズを用いて行った。撮像した画像例を図8に、抽出した核領域を図9に示す。図9より算出した核の面積のヒストグラムを図10に示す。また、画像より算出した従来の特徴量は、核の面積の平均が $68.4\mu\text{m}^2$ 、面積の分散が $283\mu\text{m}^4$ 、2次元核密度が $1.13 \times 10^3/\text{mm}^2$ であった。

算出したそれぞれの特徴量を用い、3次元核密度を推定した結果を図11に示す。確率密度が最大となる値は特徴量に依らずほぼ同じであるが、信頼区間の幅は従来の $4.14 \times 10^4/\text{mm}^3$ に対してヒストグラムを用いる場合は $3.86 \times 10^4/\text{mm}^3$ となり、規格化した値で約2.2%改善された。図7のシミュレーション結果においても倍率40倍の場合にはヒストグラムを用いる方が約2.7%改善されており、シミュレーションと同等の改善結果が得られた。

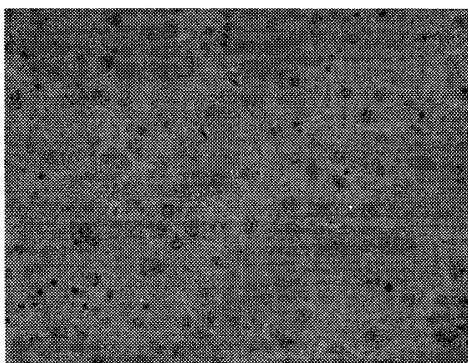


図8 撮像画像

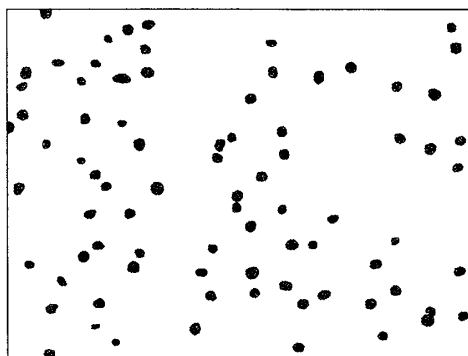


図9 核領域抽出結果

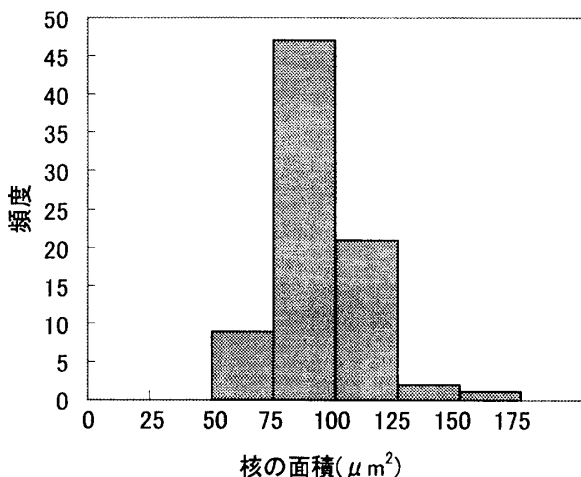


図10 実画像から算出した核面積のヒストグラム

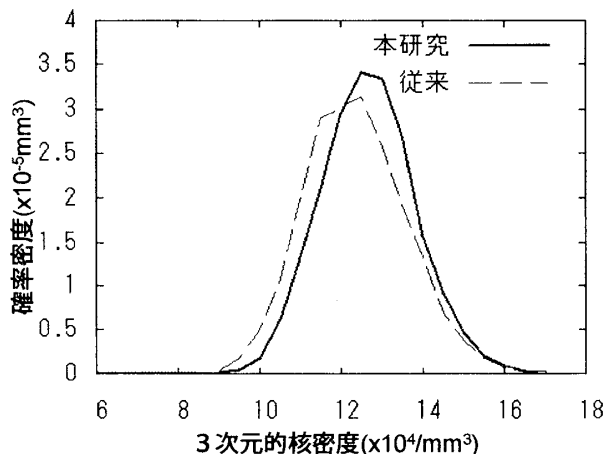


図11 3次元核密度の出現する確率密度分布

5. おわりに

2次元の病理組織画像から3次元核密度を推定する手法において、推定に利用する特徴量として核の面積のヒストグラムを用いることで信頼区間幅を低減し、推定精度を向上できることを明らかにした。また、特徴量の算出に用いる画像の標本上でのサイズ(視野サイズ)を大きくすることにより信頼区間幅を低減できることを明らかにした。ただし、視野サイズを大きくすることは特徴量の算出に要する手間を増やすことになるため、実際には要求される精度などを考慮して視野サイズを最適化する必要がある。

なお、今回の実験では特徴量を算出するために核領域を手作業で抽出したが、その抽出を半自動化し特徴量算出に要する時間を短縮することも今後の課題である。これについては、輪郭の自動抽出機能とGUIによる修正機能を含むシステムを実現して解決する予定である。

また、今回は事前確率密度 $P(\Theta)$ を一様としたが、実データを集め $P(\Theta)$ を改善することにより信頼区間の幅をさらに狭めることが可能と考える。こうした改善に加え特徴量などの改善をさらに進めることで推定精度を向上し実用的な診断支援システムを実現したい。

謝辞

本研究の一部は科研費(基盤(C)16500302)の補助による。

参考文献

- [1] M. Takahashi, M. Nakano, "Histopathologic diagnosis support system for early well-differentiated HCC", IAP2004, A20-5.
- [2] 中条進, 山本正美, 田原栄一, "計量細胞学 基礎と臨床 Image Cytometry の進歩 肝細胞癌における形態計量学的分析 核密度と核密度比の有用性について", 日本臨床, vol.50, no.10, pp.2525-2529, Oct. 1992.
- [3] 高橋正信, 中野雅行, "肝細胞癌の画像解析における標本厚さと対物レンズが核密度に与える影響", 日本病理学会会誌, vol.94, no.1, P3-I-31, 2005.
- [4] 吉見崇, 高橋正信, "肝病理組織標本2次元画像からの3次元核密度推定", 電子情報通信学会総合大会, D-16-6, 2005.