

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500413

研究課題名（和文） 病理組織標本画像の暗視野解析手法の研究

研究課題名（英文） Research on analysis of histological images using dark-field illumination

研究代表者

高橋 正信（TAKAHASHI MASANOBU）

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：20338312

研究成果の概要（和文）：

病理組織の画像解析において、これまでほとんど利用されることの無かった暗視野画像の活用法について検討した。その結果、肝臓の病理組織標本画像において、鍍銀HE染色標本から線維と核位置を同時に抽出する手法を実現した。また、HE染色標本からの細胞膜の抽出を実現すると共に、核位置と輪郭の抽出精度を改善した。即ち、暗視野画像は病理組織の画像解析に有用であった。また、これらの機能を組み込んだ診断支援システムを実現した。システムは核の位置と輪郭、細胞膜の自動抽出とGUIを用いた修正機能を持ち、様々な特徴量を算出することができる。

研究成果の概要（英文）：

Dark field image was applied for the analysis of histological images. As a result, a method to extract nuclear positions and fibers from the images of hepatic histological sections stained with silver and HE (hematoxylin-eosin) was realized. The accuracy for extracting nuclear positions, nuclear contours and cell membranes in HE-stained hepatic histological images was also improved. So, dark field images were useful in the analysis of histological images. A diagnosis support system was developed. The system has functions to automatically extract nuclear positions, nuclear contours and cell membranes. The user can easily correct wrong results using a graphical user interface, and can calculate various useful features.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用・生体画像，診断支援，病理組織

1. 研究開始当初の背景

病理組織診断は切除した組織をスライス、染色し顕微鏡で観察する診断手法であり、癌などの確定診断に用いられる最も高精度な診断手法である。その診断は専門医（病理医）により行われるが、日本の病理医の数は1500

名ほど（人口比で米国の1/5）しかおらず、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。また、技量や経験の個人差などによる誤診の恐れが指摘されている。実際に同じ組織に対して別の病理医が異なる診断結果を下すことは多く、それが最終的な診

断結果とされるだけに、診断の客観化による誤診の低減が強く望まれている。

診断を客観化する方策としては、病理医が観察している画像から客観的指標を抽出し、提示することが考えられる。肝細胞癌を例にすると、初期の癌と非癌部の鑑別には核密度が有用と考えられており、そうした診断に有用な特徴量を定量的に抽出して病理医を支援するシステムの実現が強く望まれている。画像解析により診断に有用な指標を提示するシステムもあるが、機器が非常に高額であるうえ、画像解析を容易とするために通常の診断業務ではほとんど利用されることの無い特殊な染色法を必要とするため、日本においては全くと言って良いほど普及していない。

大多数の一般の病理医を支援するためには、日常の診断に用いる一般的な染色法を利用した標本を用い、かつ日常の診断に用いている光学顕微鏡にカメラなどの機器を追加するだけで安価に実現可能な診断支援システムを実現することが不可欠と考える。

研究代表者らは、誤診の低減が望まれている初期の肝細胞癌の診断支援を目的として、核密度などの特徴量を半自動で算出する機能を実現し、それを用いた診断支援システムを実現した。これはHE染色標本の画像から核の位置や輪郭を自動的に抽出し、核密度などの算出を支援するものである。しかし、リンパ球や内皮細胞の核など、肝細胞の核に紛らわしいものがあるため、核総数の3割程度の修正が必要となり、核の抽出正解率の改善が課題となっている。また、細胞膜は重要な構成要素であるが、核などの他の構成要素と色が似ているために抽出することが困難であった。

こうした問題点を解決する方法として、研究代表者は暗視野の利用を考えた。病理医が標本を観察する際に用いる明視野は、標本を透過した光を観察する手法であり、標本による光の吸収量の違いが観察できる。一方、暗視野は透過光が対物レンズに入らないように照明し、対象物により反射・散乱された光のみを観察する方法である。通常は微小物体の観察に利用するものであるため、病理組織標本に対して用いられたことはほとんど無い。しかし、暗視野は光の反射率や散乱率という明視野には無い情報を持っており、それらの活用により新たな解析技術の実現が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、病理組織標本の画像解析において、これまでほとんど試みられることの無かった暗視野画像に的を絞る、その新しい可能性を追求する。具体的には、病理組織標本を構成する様々な要素（核、線維など）につ

いて、暗視野撮像時の諸特性を明らかにすると共に、その結果を元に核などの各構成要素を識別する手法を実現する。そして、最終的には診断に有用な特徴量を算出する機能を実現するのが本研究の目的である。なお、実現した機能を容易に利用できるようにするためのGUIも実現する。なお、解析対象とする病理組織としては、背景などで述べた理由により病理医のニーズが高い肝組織を候補とする。

3. 研究の方法

肝病理組織標本の暗視野画像、明視野画像、および位相差画像を撮像し、それらを元に病理組織の構成要素（核や細胞膜など）の抽出の可能性について検討した。その結果、以下の課題の解決に有望そうであることが解り、その実現を図った。

(1) 鍍銀HE染色標本からの線維と核の抽出

鍍銀HE染色とは、線維を染める鍍銀染色と診断に通常利用されるHE染色を組み合わせたものである。鍍銀染色を組み合わせることで、核だけでなく線維の抽出も可能になるため、組織の構造的な特徴を抽出しやすくなると共に、N/C比などの特徴量の抽出も容易になることが期待できる。

(2) HE染色標本からの細胞膜の抽出

HE染色標本中での細胞膜は核などと似た色をしているため、細胞膜だけを抽出することはこれまで困難だった。暗視野画像などを組み合わせることで、その抽出の実現を図った。細胞膜の抽出が可能となると、核の抽出機能と組み合わせることでN/C比などの特徴量の算出が可能となる。

(3) 核位置と核輪郭の抽出精度改善

核位置と核輪郭の抽出は明視野画像でも実現しているが、暗視野画像などを組み合わせることで、さらなる精度改善を図った。これにより、人手による修正の手間の低減が期待できる。

(4) N/C比算出機能

核位置と輪郭の抽出機能と細胞膜の抽出機能を組み合わせることでN/C比の算出機能の実現を図った。N/C比は核と細胞質の面積比である。初期の肝細胞癌のN/C比は非癌部に比べて高くなるとされており、診断に有用な特徴量の一つである。

(5) 診断支援システム

N/C比算出機能などを組み込んだ診断支援システムの実現を図った。

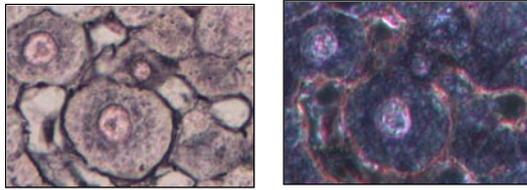
4. 研究成果

(1) 鍍銀HE染色標本からの線維と核の抽出

実現した手順の概要は以下のとおりである。

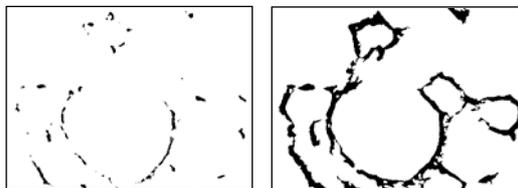
[銀顆粒抽出] 図1(a)の明視野画像から線維を抽出するにあたっては、線維と同じよう

に黒色をしている銀顆粒との区別が難しいという問題がある. 一方, 図 1 (b) の暗視野画像では, 銀顆粒は黒いものの線維は明るく映っている. そこで, 暗視野画像における両者の差を利用することで, まず銀顆粒を抽出した.



(a) 明視野 (b) 暗視野
図 1 鍍銀 HE 染色標本の画像

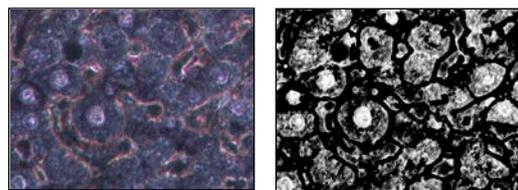
[線維抽出] 明視野画像から銀顆粒領域を削除した画像から線維を抽出するが, 銀顆粒以外にも核の輪郭や細胞膜の一部が暗く染まっており, 単純な 2 値化では線維との識別が難しい. 一方, それら線維に紛らわしい領域は暗いものの, 領域中の最も暗い画素値を比較すると, 線維よりも高いことがわかった. そこで, 線維に紛らわしい領域が抽出されない閾値で 2 値化した画像を線維のシード(種)として, 閾値を上げながらシードに隣接する領域のみを追加していき, 線維のみを抽出した.



(a) 線維の種 (b) 線維抽出結果
図 2 線維の抽出

線維の長さを評価基準として 9 枚の標本を用いて精度評価を行った結果, 線維の抽出正解率 91.9%, 誤抽出率 12.3%であった.

[核位置抽出] 核位置は暗視野画像 (図 3 (a)) から銀顆粒と線維領域を除いた画像 (図 3 (b)) を作成し, 2 値化やオープニング処理などを組み合わせて抽出する. 実験による評価を行った結果, 抽出正解率は 83.4%, 誤抽出率は 25.4%であった.



(a) 暗視野画像 (b) 銀顆粒と線維除去
図 3 核位置の抽出

(2) HE 染色標本からの細胞膜の抽出

細胞膜の色は明視野画像では他の構成要素に似ており抽出が難しい. そこで, 暗視野画像と位相差画像の色情報を組み合わせることで抽出を試みた. 特徴量としては画素の色情報 (RGB とその色度) を利用した. 手動で作成した正解画像よりサンプリングした学習データとテストデータを用いて細胞膜とそれ以外の領域(非細胞膜)の抽出正解率を評価した. なお, 識別器には階層型ニューラルネットワークと SVM (サポートベクターマシン) を用い, 両者を比較した.

3 種類の画像の色情報の様々な組み合わせについて比較実験を行った結果, 特徴量として「明視野画像の色と色度, 暗視野画像の色, 位相差画像の色」を用い, 識別器としてニューラルネットワークを用いた場合に最も良い結果が得られた. なお, 計算時間の点でも SVM よりもニューラルネットワークの方が少なく, 優れていた. 3 種類の画像を用いた場合と「明視野画像の色と色度のみ」を用いた場合のテストデータに対する ROC 曲線 (細胞膜と非細胞膜の抽出正解率の関係) の例を図 4 に示す. 3 種類の画像を用いることで抽出正解率は改善した.

ROC 曲線のうち, 細胞膜抽出正解率が 70% に相当するところでの細胞膜抽出結果に対して小領域削除を施した結果画像の例を図 5 (b), (c) に示す. 図中の黒色は正しく抽出された細胞膜, 赤色は細胞膜として誤抽出され

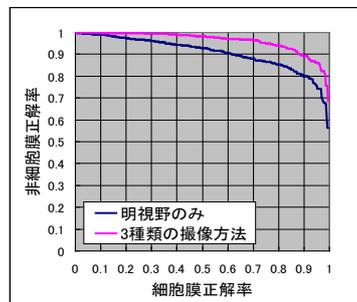
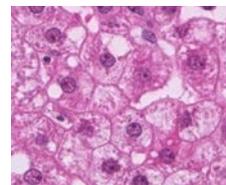
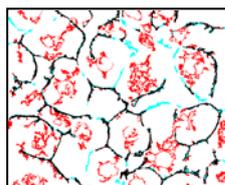


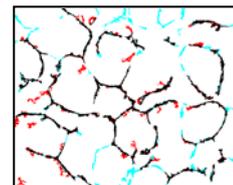
図 4 細胞膜抽出の ROC 曲線



(a) 明視野画像



(b) 明視野画像のみ



(c) 3種類の画像

図 5 細胞膜抽出結果

た領域、シアン色は抽出されなかった細胞膜である。

明視野のみの場合には非細胞領域のうち9.6%が細胞膜として誤抽出(赤色)されているが、3種類の画像を用いることで誤抽出率は2.2%と1/4以下に低減された。

(3)核位置と核輪郭の抽出精度改善

手順の概要は以下のとおりである。

[明視野と暗視野のR合成画像]暗視野画像と明視野画像の様々な合成の仕方について実験的に評価した結果、両画像のRチャンネルを重み付き合成した場合に精度が改善されることが解った。明視野画像、暗視野画像、および両者のR合成画像の例を、それぞれ図6、図7、図8に示す。

[核強調画像の作成]核と核以外の領域の色情報(明視野、暗視野、位相差の色と色度)を用いて学習したニューラルネットワークを用いて核を抽出した2値画像を作成し、それを平滑化してR合成画像と重み付き合成した画像(核強調画像)(図9)を作成する。
[類洞内のリンパ球除去]核位置抽出の際にはリンパ球などの類洞内の物体が誤抽出の原因となるが、類洞を抽出し、その内部から核が抽出されないようにすることで、誤抽出を低減する。

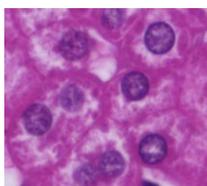


図6 明視野画像

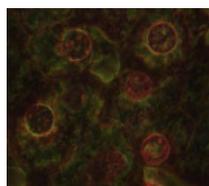


図7 暗視野画像

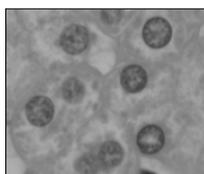


図8 R合成画像

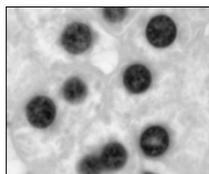


図9 核強調画像

早期肝細胞癌の標本10枚から癌部、非癌部を各1枚ずつ撮影した計20枚の標本画像を用い、抽出精度を評価した。核位置の抽出精度(修正率)を表1に示す。修正率は次式で算出される「修正が必要な位置の割合」であり、低いほど良い。核強調画像と類洞内の核候補点除去を組み合わせることにより、修正率を6.6%改善し、11.5%にまで低減できた。

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

核輪郭については、抽出された輪郭と正解との誤差が基準以内である場合を正しく抽

出されたと判断した。核輪郭の抽出正解率を表2に示す。核強調画像を利用することで、正解率を従来の明視野のみを用いる場合に比べ2.8%改善し、89.3%に向上できた。

表1 核位置抽出の修正率

明視野	明視野のみ	18.1[%]
明視野+	R合成のみ	15.0[%]
暗視野+	R合成核強調+	11.5[%]
位相差	類洞	

表2 核輪郭抽出の正解率

明視野	明視野のみ	86.5[%]
明視野+	R合成のみ	88.1[%]
暗視野+	R合成核強調	89.3[%]
位相差		

(4)N/C比算出機能

実現した細胞膜抽出機能などを利用してN/C比算出機能を実現した。算出手順の概要は以下のとおりである。

[核抽出]核位置と核輪郭を自動抽出し、GUIの修正機能で必要に応じて修正し、核の面積を得る。

[細胞膜抽出](2)で説明した細胞膜抽出機能により細胞膜を抽出する。なお、抽出された結果から細胞膜の教師データを修正し再学習、再抽出処理を繰り返すことで抽出精度を改善できる。

[細胞膜の自動閉領域化]抽出した細胞膜は、図10のように必ずしも閉領域になるとは限らない。そこで、途切れた細胞膜部分の補正を自動化することで、手動で修正する手間の削減を図った。

補正は、基本的に細胞膜の途切れた位置(端点)と角となっている点(角点)のうち位置が近いものを補間することによって行う。そのため、まず細胞膜抽出結果の小領域を削除後、細線化を行う。次に、画像上の端点を検出する。そして、通過点(端点や分岐点ではない点)について、隣接する画素を両方向それぞれについて最小二乗法で直線近似し、2直線の角度が150度以下となる画素を角点として検出する。次に、検出した端点及び角点が一定距離以内となる組み合わせについて、距離が近いものから以下の条件を満たすものを直線で繋ぐ。

①繋いだ直線で小領域が形成されない:細線化画像に存在するひげの影響で、繋いだ直線で小領域が形成されることがある。しかし、細胞はある程度の大きさを持つことから、小領域を形成する直線は細胞膜を補正する線ではないと判断する。

②繋いだ直線が他の線と交差しない:細胞膜は細胞を囲む1つの線であるから、他の線と交差することはない。

これらの条件を満たして繋ぐことができた直線を、細胞膜を補正する線として細胞膜抽出結果上に描画する。自動補正後の画像例を図11に示す。

また、自動補正後に閉領域になっているか視覚的にわかりやすくするため、リアルタイムでのラベリングで閉領域を検出し、自動的に赤色にする機能を実装した。これにより、閉領域かどうかが即座に判断可能となった。図12に自動補正前の結果、図13に自動補正後の結果例を示す。自動補正を用いても補正できない細胞膜に対してはGUI上で手動で補正を行う。

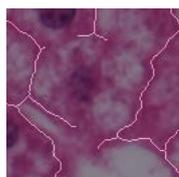


図10 自動補正前

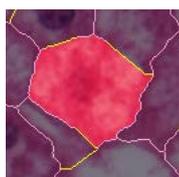


図11 自動補正後

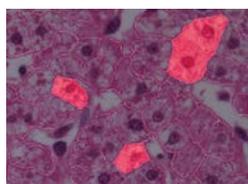


図12 自動補正前

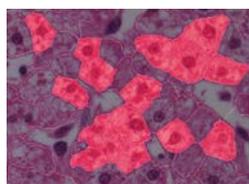


図13 自動補正後

実現したGUIを用いて、標本画像からN/C比を算出する実験を行った。なお、GUIはC#で作成した。実験には800×600画素の5標本を用い、全て手動で細胞膜を抽出した場合、自動で細胞膜抽出を行い手動で補正した場合、手動補正の前に自動補正機能を使用した場合の3つの場合を比較した。なお、N/C比算出が目的であるため、核が含まれる細胞の細胞膜のみを比較対象とした。また、自動補正機能使用後には閉領域とならなかった細胞に対して手動補正を行い、細胞全ての面積を算出できる状態とした。

細胞膜の自動補正機能が有る場合と無い場合について、細胞補正率（細胞のうち手動で閉領域化する必要があるものの割合）、細胞面積の誤差、N/C比の誤差を求めた。なお、正解の細胞面積としては細胞膜を手動抽出したものをを用いた。結果を表3に示す。細胞補正率は約92%から約59%へと大幅に改善され、細胞膜を手動で補正する手間が大幅に軽減できた。さらに、面積の誤差、N/C比の誤差ともに自動補正機能により約2/3に低減され、自動補正機能は手間の軽減だけでなく、精度改善にも有効であった。

表3 細胞膜自動補正の効果

自動補正	細胞補正率	面積誤差	N/C比誤差
無	92.0%	2.90%	0.41%
有	58.7%	1.91%	0.28%

(5) 診断支援システム

実現した機能を診断支援システムに組み込み、利用者が容易に利用できるようにした。システムのうちN/C比算出用GUIを図14に示す。実現したシステムは核の位置と輪郭、細胞膜の自動抽出とGUIを用いた修正機能を持ち、様々な特徴量を算出することができる。

複数の標本を用いた評価の結果、算出できる特徴量のうち、少なくとも核密度、核の円形度、核の集中度（核の局所的な密集を定量化した特徴）については初期の肝細胞癌の診断に有用となる可能性が明らかとなった。

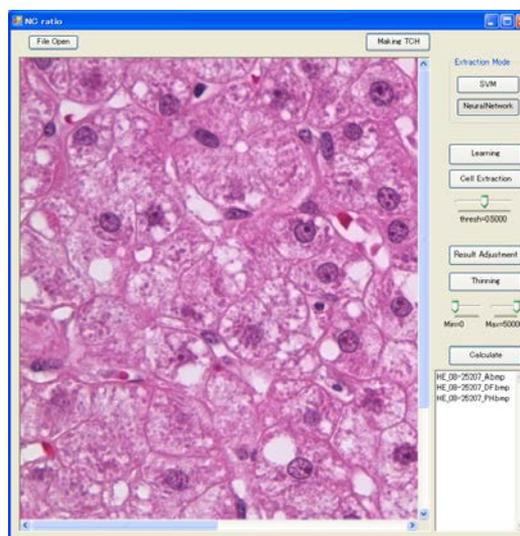


図14 N/C比算出用GUI画面

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① 中野雅行: 「EOBにおける肝実質相での欠損の病理組織診断」, *Liver Cancer*, 17 巻, pp.9-14, 2011. 査読無
 - ② Keiichi Fujiwara, Masayuki Nakano, 他 4 名: "Advanced histology and impaired liver regeneration are associated with disease severity in acute-onset autoimmune hepatitis", *Histopathology*, Vol.58, pp.693-704, 2011. 査読有, 10.1111/j.1365-2559.2011.03790.x
 - ③ 沼田和司, 他 7 名, 7 番目: 「早期肝細胞癌の造影超音波」, *肝臓*, 52 巻, pp.429-440, 2011. 査読有
 - ④ 中野雅行: 「肝細胞癌前癌病変, 早期肝細胞癌とその類似病変」, *肝臓—基礎・臨床研究*, 67 巻, pp.54-59, 2009. 査読無
 - ⑤ 中野雅行: 「肝細胞癌と鑑別する必要がある肝病変の病理組織」, *画像診断*, 29 巻, pp.562-570, 2009. 査読無
 - ⑥ 中野雅行: 「Fibrolamellar carcinomaの新知見について」, *Liver Cancer*, 15 巻, pp.87-92, 2009. 査読無
- 他 6 件

[学会発表] (計 25 件)

- ① 松下伸光, 高橋正信, 中野雅行: 「肝病理組織標本画像のN/C比算出システムの改善」, 電子情報通信学会総合大会, D-7-19, 岡山大学, 2012.3.20
- ② Masanobu Takahashi, Jumpei Koichi, Yuuki Makino, Takuya Kitani, Masayuki Nakano: "Segmentation of Nuclei in Hepatic Histological Images Using Multimodal Method", 5th European Congress for Medical and Biomedical Engineering, pp.639-642, Budapest, 2011.9.16
- ③ 松下伸光, 高橋正信, 中野雅行: 「肝病理組織標本画像のN/C比算出システム」, 情報科学技術フォーラム (FIT2010), G-013, 九州大学, 2010.9.8
- ④ Nobumitsu Matsushita, Masanobu Takahashi, Masayuki Nakano: "Multimodal Method for Cell Membrane Extraction in Hepatic Histological Images", 32th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, FFrBPo07.5, pp.4068-4071, Buenos Aires, 2010.9.3
- ⑤ 谷本泰章, 高橋正信, 中野雅行: 「早期肝細胞癌向け病理診断支援システム」, 電子情報通信学会医用画像研究会, MI2009-63, 九州工業大学, 2009.9.16

- ⑥ Masanobu Takahashi, Yasuaki Tanimoto, Masayuki Nakano: "Extracting Morphometric Features from Histopathologic Images of Liver", World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (WC2009), Munich, PD.134, 2009.9.9
 - ⑦ Yasuaki Tanimoto, Masanobu Takahashi, Kengo Oguruma, Masayuki Nakano: "New Feature for Histopathologic Diagnosis of Early Hepatocellular Carcinoma - Degree of Nuclear Concentration -", World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (WC2009), Munich, 04/01.16, 2009.9.9
 - ⑧ 高橋正信, 中野雅行: 「早期肝細胞癌の診断のための新異型の開発」, 日本病理学会, Vol.98, No.1, P3-26, 京都国際会議場, 2009.5.3
 - ⑨ 中野雅行, 高橋正信: 「早期肝細胞癌の組織診断支援システム (核の円形度, 核密度等) の開発」, 日本病理学会, Vol.98, No.1, P3-24, 京都国際会議場, 2009.5.3
- 他 16 件

[図書] (計 1 件)

- ① 井廻道夫 (企画), 中野雅行, 他, 「これでわかる! 慢性肝炎の治療戦略 肝臓を防ぐためのマネジメント」, 羊土社, pp.34-42, 2011.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 正信 (TAKAHASHI MASANOBU)
芝浦工業大学・システム理工学部・教授
研究者番号: 20338312

(2) 研究分担者

中野 雅行 (NAKANO MASAYUKI)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター
・教授
研究者番号: 00092073