

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24500514

研究課題名(和文)合成撮像による病理組織標本画像解析

研究課題名(英文)Composite imaging method for histological image analysis

研究代表者

高橋 正信(Takahashi, Masanobu)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号：20338312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：光学顕微鏡の3種類の撮像法(明視野, 暗視野, 位相差)の合成画像を一度に撮影する手法を実現した。異なる撮像法の異なるチャンネルの画像や照明方向が異なる暗視野画像を一度の撮影で得る手法も実現した。また, 複数の撮像法による画像や合成撮影画像が, 胃のHE染色標本中のピロリ菌の視認性と抽出精度の改善や, 肝臓のHE染色標本や無染色標本の視認性と画像解析精度の改善に有用であることを明らかにした。また, 明視野画像のみを用いた場合についても肝臓の標本中の特徴量分布を可視化する手法を実現した。実現した機能の一部を診断支援システムに組み込み, 診断に有用な特徴量を抽出できる機能を実現した。

研究成果の概要(英文)：A composite imaging method has been developed that enables the user to directly capture a composite image by one-image capturing. The composite images of bright-field, dark-field, and phase-contrast images can be captured with an arbitrary composition ratio. Both different channels of different capturing methods and two dark-field images with different illumination directions can also be captured by one-image capturing. Three kinds of images and their composite images were useful to improve both the visibility and the accuracy for extracting *Helicobacter pylori* in HE-stained gastric histological sections. Those images were also useful for improving the visibility and the accuracy for image analysis of both HE-stained and unstained liver sections. A method for estimating and visualizing the distributions of features in hepatic histological sections was also developed. A part of developed functions were introduced in a diagnosis support system to extract useful features.

研究分野：画像処理, 画像計測, 画像認識, 画像応用システム, 医用画像

キーワード：画像解析 診断支援 病理診断 病理組織 暗視野 位相差 光学顕微鏡 肝臓

1. 研究開始当初の背景

病理組織診断はスライスした病理組織を染色し顕微鏡で観察する診断手法であり、癌などを診断する最も高精度な診断手法である。しかし、専門医(病理医)の数が少ない上、診断が主観的に行われるため誤診の恐れが指摘されており、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、診断に使用す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、初期癌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。画像解析による支援システムとしてはDako社のACIS®があるが、機器が非常に高額なうえ、特殊な染色法を必要とするため日本で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、特に初期癌の誤診の低減が望まれている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診断支援システムを実現した。これは標本の明視野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、リンパ球など核に紛らわしいものがあるため抽出結果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、診断に有用な情報であるN/C比(核と細胞の面積比)の算出には細胞膜の抽出が必要となるが、他と色が紛らわしいためにその抽出が困難であった。

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試みた。暗視野画像は病理組織標本に対して用いられたことはほとんど無かったが、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いる。そうした暗視野画像により得られる新たな情報を利用し画像解析精度の向上に取り組んだ結果、核や核輪郭の抽出正解率を改善できるだけでなく、細胞膜の抽出が可能となるなど、暗視野画像の有用性が明らかとなった。

この結果を受けて、研究代表者は2つの展開を考えた。一つは、同じ顕微鏡で撮影可能な他の撮像法も利用すれば、さらなる改善が可能ではないかということである。例えば、位相差画像は、暗視野画像と同様にコンデンサを回転させることで容易に撮影できる。これは標本の位相差(屈折率差)を画像化したもので、明視野や暗視野では得られない情報を含んでいる。こうした新たな情報を活用することで画像解析精度をさらに改善できる。

もう一つは撮像法に関する展開である。利用する撮像法が増えると、コンデンサを回転

させて撮影する回数が増えるため、手間がかかると同時に画像間の位置ズレが問題となる恐れがある。その解決策として、撮像法の異なる複数の画像を合成した画像を1回の撮影で得る方法を新たに考案した。この方法が実現すれば撮影が1回で済むうえ、画像のズレが無くなるなど様々なメリットが得られる。また、病理組織標本の観察法としての利用も期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、病理組織標本の画像解析において、通常は利用されない位相差などの撮像法の利用を検討すること、及び撮像法を変えて複数回撮影する代わりに、それら撮像法の合成画像を一度に撮影できる新たな撮像手法(合成撮像法)を実現することである。標本の様々な構成要素について、複数の撮像法や合成撮像法により得られた画像を用いた画像解析機能を実現するとともに、観察法としての有用性も調べる。そして、診断に役立つ特徴量を算出する診断支援機能を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 合成撮像法

① 擬似撮影

暗視野撮影では、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(図1(左))。一方、視野絞り上部に図2(b)の遮蔽板を置き、暗視野の光のみを透過させることにより、コンデンサを利用せずに同様な撮影を実現する。これを擬似暗視野撮影と呼ぶ。明視野と位相差についても、それぞれ図2(a)、図2(c)の遮蔽板を用いることにより撮影が可能である。

② 合成撮像

擬似明視野と擬似暗視野の遮蔽板のパターンを組み合わせた遮蔽板(図3(a))を用いると、図1(右)のように両者の光が加算され、明視野と暗視野を合成した画像を一度に撮影できる。2つの撮像法の合成比率は、明視野部分の光をNDフィルタで減衰することにより調整できる。具体的には、NDフィルタの減衰を大きくすることにより、暗視野の割合を増やすことができる。

同様に、遮蔽板のパターンを変更することで、位相差と暗視野(図3(b))、明視野と位相差(図3(c))、明視野と暗視野と位相差(図3(d))の合成画像も撮影可能となる。

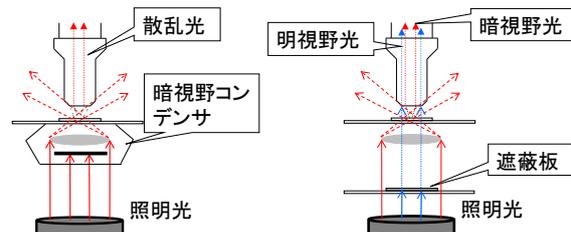
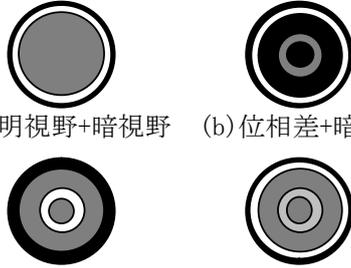


図1 暗視野(左)と合成撮像(右)の光の道筋



(a) 擬似明視野 (b) 擬似暗視野 (c) 擬似位相差  
図2 擬似撮影に使用する遮蔽板



(a) 明視野+暗視野 (b) 位相差+暗視野  
(c) 明視野+位相差 (d) 明視野+暗視野+位相差  
図3 合成撮像に使用する遮蔽板

#### (2) ピロリ菌抽出

HE染色標本の明視野画像中のピロリ菌は色が他と紛らわしいため識別が難しい。そこで、他の撮像法や合成撮像法がピロリ菌抽出に有用かを調べた。具体的にはピロリ菌の領域と他の領域の色情報のみを教師データとして学習し、抽出されるピロリ菌の数と誤抽出数を評価して、明視野よりも有用な撮像法について検討した。

#### (3) 無染色標本への適用

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。一方、染色していない標本（無染色標本）は通常の明視野ではコントラストが低く観察には適さない。そこで、明視野以外の撮像法や合成撮像法の利用について検討した。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、染色過程も不要となる。

#### (4) 明視野画像を用いた特徴量分布算出

明視野画像のみを用いた場合についても、診断に有用な特徴量の分布を可視化する手法を実現した。具体的には、肝臓の手術標本のバーチャルスライドにおける核密度と円形度などの形状特徴量を可視化する手法を実現した。核位置の抽出結果には誤りが含まれるが、それを考慮した上で核密度の推定誤差を低減できるように核と判断する条件を決定した。また、形状特徴の算出についても、核エネルギーを用いて選別した核を用いて算出することで特徴量の推定誤差を低減した。

#### (5) 診断支援機能

複数の撮像法による画像および合成撮像画像を用いて特に肝臓の病理組織標本を対象とした診断支援機能の実現を図った。

### 4. 研究成果

#### (1) 合成撮像法

##### ① 合成撮像法の評価

明視野と暗視野の合成画像は、図3(a)のような遮蔽板を用いることで、一度の撮影による取得が可能である。明視野のほうが暗視野より光量が多いため、NDフィルタを用いて明視野の光量を調整することにより、明視野と暗視野の光を擬似的に合成している。図4(a)に撮影画像を示す。これは明視野部分にND2.0をNDフィルタ用いたものである。合成画像は各撮像法の画像を元に(1)式を用いて計算機によっても作成できる(図4(b))。合成撮像画像は、この計算機合成画像との誤差(画素値の差の絶対値)により評価する。なお、 $\alpha$ 、 $\beta$ は誤差が最少となるように最適化する。

$$g = ((1 - \alpha)f_1 + \alpha f_2) \times \beta \quad (1)$$

$g$  : 計算機合成画像

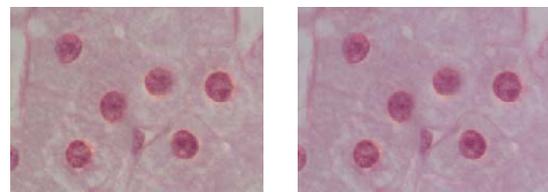
$f_1$  : 擬似明視野画像  $f_2$  : 擬似暗視野画像

$\alpha$  : 合成比率 ( $0 < \alpha < 1$ )  $\beta$  : コントラスト補正

明視野と暗視野の合成について、ND値を0.4~3.4(合成比率 $\alpha$ :0.01~0.95)の間で変化させて誤差を評価した結果を図8に赤色で示す。平均誤差は、図4に示すND2.0( $\alpha$ :0.44)の場合で0.6%、他の合成比率の場合でも1%程度以内であった。

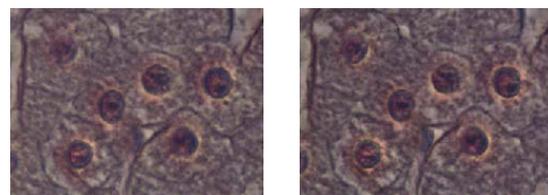
また、ND2.0を基準とし、NDの透過率をもとにした合成比率の理論値を求め、その理論値の合成比率で計算機合成画像を作成して合成撮像画像との平均誤差を評価した(図8(青))。この場合の誤差は3%以内であった。

位相差と暗視野(図5)、明視野と位相差(図6)の組み合わせについても平均誤差を評価した結果、それぞれ2.7%、2.5%程度以内と良好な結果が得られた。図7は図3(d)の遮蔽板を用いて撮像した3種類全ての合成撮像画像である。この場合も誤差は2.6%と良好な結果が得られた。



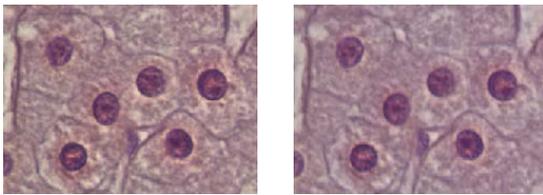
(a) 合成撮像 (b) 計算機合成

図4 明視野+暗視野の合成画像( $\alpha=0.44$ )

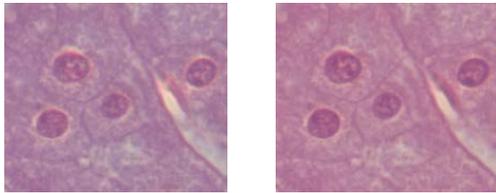


(a) 合成撮像 (b) 計算機合成

図5 位相差+暗視野の合成画像( $\alpha=0.47$ )



(a) 合成撮像 (b) 計算機合成  
図 6 明視野+位相差の合成画像 ( $\alpha=0.56$ )



(a) 合成撮像 (b) 計算機合成  
図 7 明視野+暗視野+位相差の合成画像  
( $\alpha_{DF}=0.35, \alpha_{PH}=0.28$ )

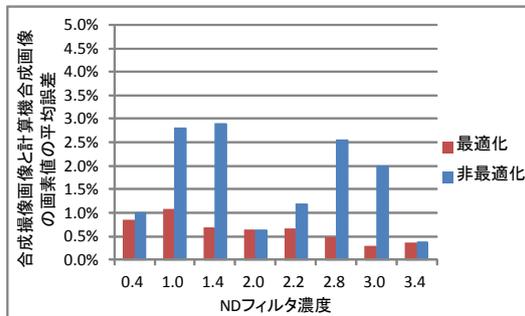


図 8 合成撮像と計算機合成の画素値の平均誤差(明視野+暗視野)

### ②複数の撮像法の同時撮影

一度で複数の撮像法それぞれの情報を撮影する手法について検討した。撮影にはカラーフィルタを利用した遮蔽板を用いる。具体的には、カラーフィルタによって特定のチャンネルの光のみを透過させ、複数の撮像法の色情報を、互いに干渉しないチャンネル毎に分離して撮影する。

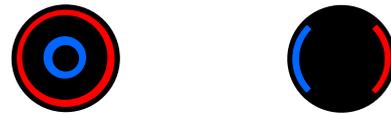
今回利用したカラーフィルタのRGBそれぞれの減衰率を調べたところ、赤フィルタと青フィルタを用いることで、RチャンネルとBチャンネルをほぼ完全に分離できることを確認した。

明視野、暗視野、位相差のそれぞれの組み合わせにおいて撮像法の同時撮影実験を行った。一例として、暗視野部分に赤フィルタ、位相差部分に青フィルタと光量を調整するためのNDフィルタを用いた遮蔽板を図9(a)に示す。得られる合成撮像画像のRチャンネルはほぼ暗視野のみ、Bチャンネルはほぼ位相差のみの情報を含むことになる。

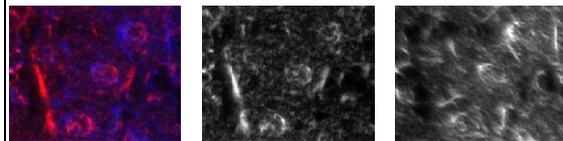
この合成撮像画像と擬似位相差画像について、両者のBチャンネル(暗視野)の画素値の平均誤差が最も小さくなるように明るさを補正して誤差を算出した結果、画素値の平均誤差は1.2%であった。Rチャンネル(位相差)についての平均誤差は0.3%であった。

同様な実験を明視野、暗視野、位相差の他の組み合わせについても行った結果、すべて誤差2%程度以内で再現できた。以上のことから、各撮像法1チャンネルずつではあるが、同時撮影できることを確認した。これにより、画像の加算だけでなく、減算など他の利用法も可能となる。

図10は、別の例として暗視野の照明方向を変えた画像を合成撮影した例である。暗視野は反射・散乱光を観察するため、照明方向を限定すると画像が変化する。そこで、例えば図9(b)の遮蔽板を用いると、右方向(R)と左方向(B)の照明による暗視野画像を合成撮影し、それぞれを分離して画像解析に利用できる。



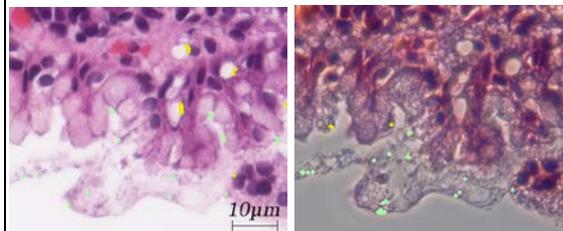
(a) 暗視野 : R, 位相差 : B (b) 左 : B, 右 : R  
図 9 カラーフィルタを利用した遮蔽板



(a) 合成撮像 (b) 右照明 (R) (c) 左照明 (B)  
図 10 照明方向の異なる暗視野画像の同時撮影(無染色標本)

### (2)ピロリ菌抽出

胃のHE染色標本を用い、3種類の撮像法による画像とそれらの合成撮影画像を用いて評価した結果、位相差と暗視野画像の合成画像を用いた場合に他と比べて良好な結果が得られた。図11の抽出結果例では、明視野のみを用いた場合に比べて抽出されるピロリ菌数が増加した。また、こうした合成撮影画像では明視野に比べてピロリ菌の視認性も改善された。



(a) 明視野 (b) 位相差+暗視野  
図 11 ピロリ菌抽出結果(緑:ピロリ菌, 黄:誤抽出)

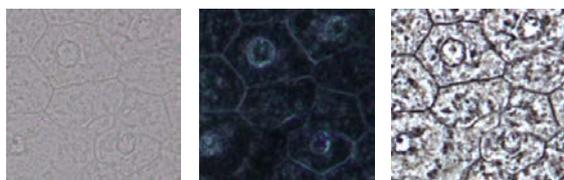
### (3)無染色標本への適用

図12は肝臓の無染色標本を明視野、暗視野、位相差で撮影した画像例である。明視野では通常はコントラストが非常に低く視認性が悪いが、開口絞りを絞ることでコントラストを改善できることが解った。これら3種

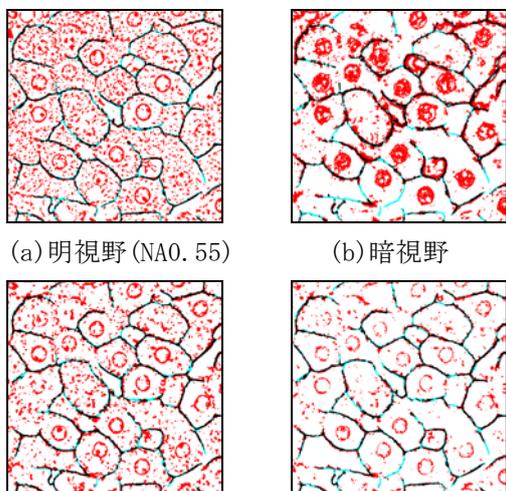
類の画像を用いて細胞膜の抽出を試み、その抽出精度を評価した。色情報（色、色度）のみを用いて学習し、細胞膜とそれ以外の平均正解率を求めたところ、各撮像法のみでの画像を用いた場合は、明視野 74.3%、暗視野 78.9%、位相差 77.6%であったが、3種類の画像を全て組み合わせることで最も良い結果（87.6%）が得られた。図 13 に抽出結果例を示す。

核位置の抽出については暗視野画像をネガポジ反転した画像に対して従来の核抽出手法を適用することで、従来の HE 染色標本と同様に核位置を抽出できることが解った。図 14 に核の抽出結果例を示す。

合成撮画像の利用についても検討したところ、暗視野と位相差の合成画像を利用することで1種類の画像よりも抽出精度を改善できることが解った。従って、例えば位相差の R チャンネルと暗視野の B チャンネルの合成撮影した1枚の画像を用いることで、細胞膜の抽出と核の抽出の両方を行うことが可能となることが解った。



(a) 明視野 (b) 暗視野 (c) 位相差  
図 12 無染色標本の撮画像



(a) 明視野 (NA0.55) (b) 暗視野  
(c) 位相差 (d) 明視野+暗視野+位相差  
図 13 細胞膜抽出結果  
(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)



図 14 核抽出結果例

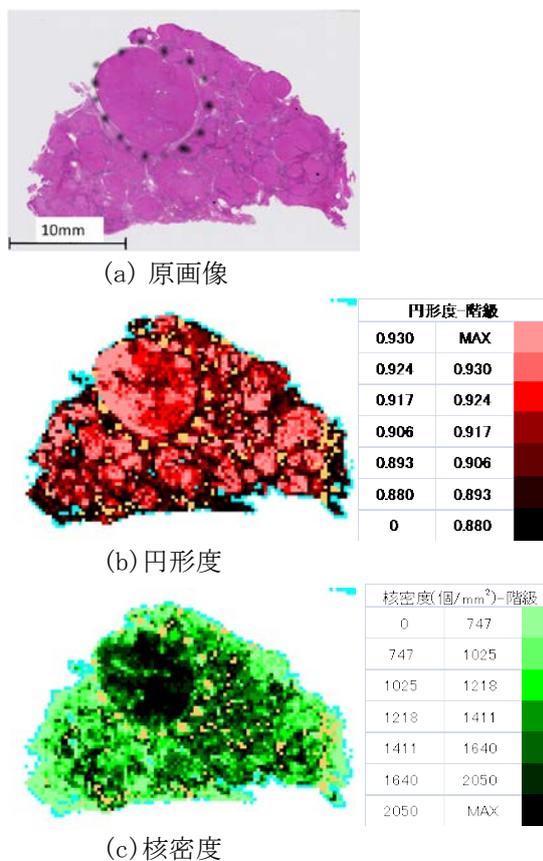
#### (4) 明視野画像を用いた特徴量分布算出

肝組織のバーチャルスライド画像（浜松ホトニクス：NanoZoomer 利用）と、小ブロックごとに抽出した核の平均円形度、核密度を可視化した画像例を図 15 に示す。ブロックは約 0.3mm 角で、色が暗いほど円形度が低い（核密度が高い）ことを示している。階級数を決めると、各階級の標本頻度が均一になるように自動で階級が割り当てられる。こうした特徴量の分布画像により、核密度や円形度などの特徴量が他と異なる領域を容易に知ることができる。

20枚のバーチャルスライドからサンプリングした40枚のブロック画像を用いて、自動算出した核密度の精度評価を行った。手動で求めた正解の核密度との平均絶対誤差は8.2%であった。図 15 の核密度の階級差は17%程度であり、誤差は階級1つ分以内と良好な結果が得られた。

#### (5) 診断支援機能

複数の撮像法による画像および合成撮画像を用い、肝臓の HE 染色および無染色の病理組織標本に対して核の位置や細胞膜などを抽出する機能を診断支援システムに組み込み、診断に有用な特徴量を抽出できる機能を実現した。



(a) 原画像 (b) 円形度 (c) 核密度  
図 15 肝臓手術標本の特徴量分布

## 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6件)

- ① Akito Nagase, Masanobu Takahashi, Masayuki Nakano: “Automatic Calculation and Visualization of Nuclear Density in Whole Slide Images of Hepatic Histological Sections”, Bio-Medical Materials and Engineering, 査読有, 2015, 印刷中
- ② 中野雅行: Cirrhosis の可逆性に関する考察, 肝胆脾, 査読無, 2014, Vol. 68, pp.705-708
- ③ 中野雅行: 肝細胞癌の多中心性発生と肝内転移, 日本臨床最新肝癌学, 査読無, 2015, Vol. 1071, pp.302-306
- ④ 中野雅行, 他: 未浸潤早期肝細胞癌 (preinvasive early hepatocellular carcinoma) の病理, 第18回肝血流動態イメージ研究会, 査読無, 2013, pp.25-29
- ⑤ 中野雅行, 他: 肝生検における早期肝細胞癌の門脈域浸潤組織像の多彩性, Liver Cancer, 査読有, Vol.18, 2012, pp.53-60  
他1件

[学会発表] (計37件)

- ① Masanobu Takahashi, Tomofumi Fujii, Masayuki Nakano: “Visualization of Features in Digital Slides of HE-Stained Hepatic Histological Sections”, XXX<sup>th</sup> Congress of the International Academy of Pathology 2014, S78, Bangkok (Thailand), 2014.10.8
- ② Takuya Ushikawa, Masanobu Takahashi, Masayuki Nakano: “Multimodal Image Analysis of Unstained Histological Sections”, 6<sup>th</sup> European Congress for the International Federation for Medical and Biomedical Engineering, T2-P3.11, Dubrovnik (Croatia), 2014.9.10
- ③ 中野雅行: 「早期肝細胞癌はどこまで診断できるか 病理形態からの挑戦」, 第49回肝癌症例検討会基調講演, 秋葉原コンベンションホール (東京), 2014.4.19
- ④ 宮本啓太, 高橋正信, 中野雅行: 「無染色標本の撮像および解析」, 電子情報通信学会総合大会, 新潟大学 (新潟), G-16-2, 2014.3.20
- ⑤ 藤井智郁, 高橋正信, 中野雅行: 「バーチャルスライドの特徴量抽出と可視化」, 電子情報通信学会総合大会, 新潟大学 (新潟), G-16-1, 2014.3.20
- ⑥ Masayuki Nakano: “Heterogeneous intensity at EOB-MRI of early hepatocellular carcinoma (HCC) is associated with heterogenous OATP1B3 expression, 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of the Study of Liver Disease, Washington D.C. (USA), 2013.11.4

- ⑦ 今井瑞穂, 宮本啓太, 高橋正信, 中野雅行: 「明視野・暗視野・位相差の合成撮像法」, 情報科学技術フォーラム (FIT2013), 鳥取大学 (鳥取), G-001, 2013.9.4
- ⑧ Mizuho Imai, Akane Takei, Keita Miyamoto, Masanobu Takahashi, Masayuki Nakano: “Composite Imaging Method for Histological Image Analysis”, 35<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, FrB05.7, Osaka International Convention Center (Osaka), 2013.7.5
- ⑨ 宮本啓太, 今井瑞穂, 高橋正信, 中野雅行: 「合成撮像法の基礎検討」, 電子情報通信学会総合大会, 岐阜大学 (岐阜), D-16-1, 2013.3.19
- ⑩ 藤井智郁, 高橋正信, 中野雅行: 「病理診断支援のための肝細胞核の自動選別」, 電子情報通信学会総合大会, 岐阜大学 (岐阜), D-16-2, 2013.3.19
- ⑪ Tomofumi Fujii, Masanobu Takahashi, Kousuke Yamada, Masayuki Nakano: “Precise Segmentation of Nuclei in Hepatic Histological Images”, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2012, Beijing (China), TH2/9.3P09, 2012.5.29
- ⑫ Keita Miyamoto, Masanobu Takahashi, Jumpei Koichi, Takuya Kitani, Masayuki Nakano: “Multimodal Method for Extracting Nuclei in Hepatic Histological Images”, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2012, Beijing (China), TH2/9.3P15, 2012.5.29
- ⑬ Masayuki Nakano: “Preinvasive early HCC”, Annual Meeting of the Laennec Liver Pathology Society Meeting, Heiderberg (Germany), 2012.5.17  
他24件

[図書] (計4件)

- ① 池田健次編著 (中野雅行), 中外医学社, 肝癌診療Q&A, 2013, pp.84-86, 97-99.  
他3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・医学部・教授  
研究者番号: 00092073