

令和 4 年 10 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18064

研究課題名（和文）自家蛍光を用いた未染色病理標本のデジタル染色・定量化法の開発

研究課題名（英文）Development of digital staining and quantification method for unstained pathological specimens using autofluorescence

研究代表者

石川 雅浩（Masahiro, Ishikawa）

埼玉医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：70540417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：自家蛍光画像を用いた未染色標本のデジタル染色法の開発を目指して研究を行った。デジタル染色に適した自家蛍光画像の決定、自家蛍光画像と染色画像の位置合わせ、深層学習を用いたデジタル染色の実現という成果が得られた。しかし、自家蛍光が確認できない細胞核が存在することが判明し、今後更なる手法の改善が必要となることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未染色標本のデジタル染色が実現されれば、貴重な組織の染色が必要なくなる点や病理診断を行う際に、一つの組織で様々な染色が可能となることが期待される。これは病理診断の効率化や貴重な組織の保管など医学的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to develop an unstained specimen digital staining method for use with autofluorescent images. After determining an autofluorescent image suitable for digital staining, the autofluorescent image and stain image were aligned and digital staining could be implemented using deep learning. However, the study also found that autofluorescence cannot be confirmed for some cell nuclei, proving that further technique improvements will be required in the future.

研究分野：病理画像処理

キーワード：画像処理 病理画像 自家蛍光 デジタル染色 深層学習

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

病理診断は、がんや多くの疾患の確定診断や治療方針の決定など重要な役割を担っている。これは、病理診断が組織を直接観察するため、血液検査や画像診断に比べてより正確な診断が可能と考えられているからである。しかし、病理標本の染色は標準化されておらず、診断も専門医が経験的に評価するため定量性が低く、医療施設によって診断精度に差が生ずることが社会問題となっている。これに対して、定量的な未染色イメージング法が開発されれば画期的な解決策になると考えられる。未染色イメージング法として、誘導ラマン散乱顕微鏡を用いた研究が広く知られている(Y.Ozeki, Nat. Photonics 6,2012)。また、自家蛍光寿命イメージング技術による HeLa 細胞の pH イメージング技術も提案されている(S.Islam, Int. J.Mol. Sci 14(1), 2013)。しかし、従来研究の多くは染色標本とは大きく異なるイメージング技術であり、組織の微細な変化を観察する病理診断への応用は非常に障壁が大きいと考えられる。病理標本を対象とした技術では、Multi-Spectral Image(MSI)の分光透過率をクラスタリングして領域を抽出し、デジタル染色する技術が提案されている(P.A.Bautista, Opt Rev 12(7), 2005)。しかし、未染色標本は吸光が非常に小さく、ノイズの影響を受けやすいため多くの標本で安定した精度を得ることは困難である。したがって、病理診断へ活用可能な未染色標本のイメージングや定量化を実現する手法は未だ確立されていない。

2. 研究の目的

組織や細胞の観察は時間のかかる染色に依存しており、それを打開するために未染色イメージング法の研究が世界中で進められている。しかし、組織内部の微細な染色の違いを観察する病理診断に応用可能な未染色イメージング法は未だ提案されていない。本研究の目的は、自家蛍光を用いて未染色病理標本から高精度なデジタル染色を実現することである。

3. 研究の方法

本研究では未染色標本のデジタル染色・定量化を実現するために、「A.デジタル染色に有効な自家蛍光画像の取得」、「B.自家蛍光からの色素量推定法の開発」、「C.組織の抽出・定量化と抽出精度の評価」の課題を設けて、それぞれ計算機上にアルゴリズムを実装して検討を進める。まず、A.は分光蛍光光度計では標本中の各組織の特性を分けて取得するのは難しいため、蛍光撮像に利用可能なフィルタを試して、染色標本との関係を見ながらデジタル染色に適した蛍光フィルタを検討する。加えて、自家蛍光と MSI 画像の位置合わせを行って色素量推定の環境を整える。次に、B.は位置合わせした自家蛍光と MSI から画素単位で色素量推定法を開発する。最後に C.は推定した色素量から得られる分光透過率や自家蛍光を組み合わせて組織構造の抽出・定量化を実現し、色素量の推定、分光透過率の推定、デジタル染色の精度評価を行う。当初の計画を表 1 に示す。

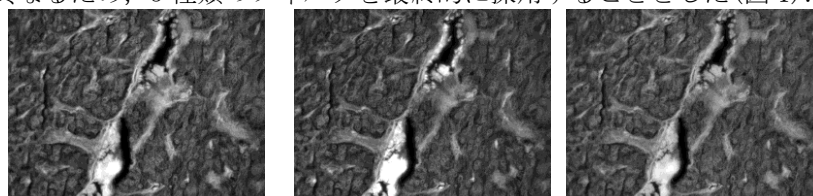
表 1 研究計画

| 実施項目                   | 平成 29 年度 |    | 平成 30 年度 |    |
|------------------------|----------|----|----------|----|
|                        | 前期       | 後期 | 前期       | 後期 |
| A-1：自家蛍光に用いるフィルタの決定    | ■        |    |          |    |
| A-2：MSI と蛍光顕微鏡画像の位置合わせ | ■        |    |          |    |
| B：色素量推定法の開発            | ■        | ■  |          |    |
| C-1：組織の抽出と定量化          |          | ■  | ■        |    |
| C-2：開発手法の精度の検証と手法の改善   |          |    | ■        | ■  |

4. 研究成果

研究の方法で計画した実施項目に従って研究成果を報告する。

「A-1」：自家蛍光画像のデジタル染色に適したフィルタについて検討を行った。紫外、青色、緑色、赤色の 4 種類の励起光フィルタを用意して検証を行った。その結果、基本的には紫外を励起光として与えた方が全体的に組織の構成を認識可能だが、膠原線維など一部の組織で励起光によって発光が異なるため、3 種類のフィルタを最終的に採用することとした(図 1)。



(a) 紫外励起光

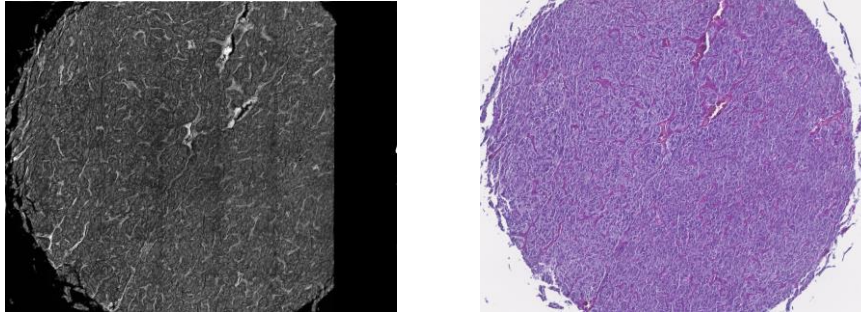
(b) 青色励起光

(c) 緑色励起光

図 1 自家蛍光画像

「A-2」：MSI と蛍光顕微鏡画像の位置合わせ

本申請では、HSI カメラで用いた HSI と RGB カメラで撮影した RGB 画像を研究に用いる。この対応関係を学習するには 2 枚の画像の位置を合わせる必要がある。また、自家蛍光画像は狭い範囲の視野しか撮影することができず、XY-ステージを移動しながら標本全体を撮影する。このため、組織全体を取得するには狭い範囲の視野を撮影した画像を複数結合する必要がある。本研究では、SURF を用いて特徴点を検出し、画像間で特徴点を探索する範囲を大まかに限定することで大きな一枚の画像に結合することとした。結合した結果を図 2(a)に示す。また、位置合わせ先に使用した Whole Slide Scanner で撮影した HE 染色画像を図 2(b)に示す。



(a) 自家蛍光画像

(b) HE 染色画像

図 2 自家蛍光画像と HE 染色画像

「B」：色素量推定法の開発

本工程では、当初 HE 染色標本を HSI で撮影した画像の色素量を目標として自家蛍光画像から色素量を推定する計画だったが、深層学習を用いることで直接 HE 染色画像を推定できることが明らかとなった。そのため、本申請では本工程は深層学習を採用して RGB カメラで撮影した自家蛍光画像と RGB カメラで撮影した HE 染色画像を対応付けることとした。詳細については、現在特許申請中のため記載しないこととする。

「C-1, C-2」：本工程では、細胞核を対象として定量化実験を行った。作成したデジタル染色画像から細胞核の描写を確認した。結果として、自家蛍光画像中で全く確認できない細胞核が存在することが明らかとなった。このため、今後の課題として自家蛍光にうつらない細胞核を補正する手法が必要になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Masahiro Ishikawa, Chisato Okamoto, Kazuma Shinoda, Hideki Komagata, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume, Akinobu Shimizu, and Naoki Kobayashi | 4. 巻<br>10                  |
| 2. 論文標題<br>Detection of pancreatic tumor cell nuclei via a hyperspectral analysis of pathological slides based on stain spectra                                       | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Biomedical optics express   | 6. 最初と最後の頁<br>pp. 4568-4588 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1364/BOE.10.004568  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する                |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

|   |                                 |               |
|---|---------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>染色画像推定器学習装置、画像処理装置、染色画像推定器学習方法、画像処理方法、染色画像推定器学習プログラム、及び、画像処理プログラム | 発明者<br>石川雅浩、小林直樹、鈴木賢治、小尾高史、鈴木裕之 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2019-041046   | 出願年<br>2019年                    | 国内・外国の別<br>国内 |
| 産業財産権の名称<br>画像処理装置、画像処理方法、画像処理プログラム   | 発明者<br>石川雅浩、中野和也、小林直樹           | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2017-165001   | 出願年<br>2017年                    | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究協力者 | 中野 和也<br><br>(nakano kazuya)<br><br>(80713833) | 宮崎大学・キャリアマネジメント推進機構・助教<br><br><br>(17601) |    |
| 研究協力者 | 阿部 時也<br><br>(abe tokiya)<br><br>(10422552)    | 慶應義塾大学・医学部病理学教室・助教<br><br><br>(32612)     |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|