

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590861

研究課題名(和文)溺死診断のための全自動プランクトン検査装置の開発

研究課題名(英文)Development of automatic plankton test for diagnosis of drowning

研究代表者

吾郷 一利 (Ago, Kazutoshi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20102056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自動的にプランクトン(珪藻)検査を行うためには、壊機法の自動化とプランクトン検索の自動化と2つのステップが必要になる。研究期間内において、特にプランクトンの自動検索システムの構築について成果を得ることができた。自動検索システムは、電動ステージを装着した顕微鏡観察装置を用い、市販の画像連結ソフトウェア(e-Tiling)によるプレパラート標本からのサンプル情報の取り込み、連結画像より画像計測・統計ソフトウェア(WinROOF)により行うものである。システム導入により、改善の余地はあるもののプレパラート標本をデジタルデータとして永久保存できることや検索が瞬時に行えることなどの効果が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Two automatic systems: acid digestion of samples and detection of plankton, are necessary for automatic plankton (diatom) test which diagnoses death by drowning. In this study, the potential results were acquired on the automatic detection of plankton. The automatic system is composed of image tiling software (e-Tiling, MITANI Corpotation), image analysis software (WinROOF, MITANI Corpotation) and light microscopy which is equipped with motorized stage (ProScan, PRIOR Scientific). Though the time of tiling by e-Tiling was too long (over 1 hour /a slide), there was a merit where the information of prepared slides is permanently preserved as digital image. On WinROOF, though the ability of discrimination of plankton species was not sufficient, the speed of search was remarkably faster than manual detection. It was revealed that the new system adopting e-Tiling and WinROOF would bring an improvement to the plankton test for diagnosis of drowning.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理 溺死 プランクトン検査 珪藻検査 壊機法 画像解析 自動化

1. 研究開始当初の背景

溺死を示唆する有力な根拠として外表検査においてみられる鼻孔、口腔からの細小泡沫ならびに内景検査においてみられる気管、気管支内の細小泡沫、また溺水吸引による肺の膨隆などの溺死肺の所見があるが、これらの所見も数日で観察されなくなる。そのため確実な溺死診断として溺水に含まれるプランクトン、とくに強酸による壊機によっても殻の形態が保たれる珪藻を臓器より検出し、溺水吸引の根拠とする方法が用いられてきた。この方法は高温下において発煙硝酸、硫酸を用いることから危険をとまなう作業である。また、顕微鏡を用いてプランクトンを検出する作業も強拡大(400倍)で行わなければならない労力を要する作業である。そこで、本研究では術者への負担を軽減するために、強酸による壊機作業およびプランクトンの検索・分類作業にそのような技術を取り入れた自動プランクトン検査装置の開発を計画した。さらには、自動プランクトン検査装置を日常検査に導入することにより、個人間あるいは検査機関間における手技の標準化が計られ、検査精度の向上が期待できるものと考えた。

2. 研究の目的

溺死の確定診断法として溺水に由来する外来異物を体内より検出することが行われており、生態系に広範に存在するプランクトン(主に珪藻)がその対象とされる。試料を強酸により壊機処理し、肺および脾、肝、腎などの末梢臓器からプランクトンを検出する方法が広く用いられてきた。検出感度の高い方法であるが、強酸による壊機、酸の洗浄除去、プレパラート作成、鏡検によるプランクトン検出と一連の労力を要する操作ならびに強酸(発煙硝酸および硫酸)を用いることによる危険性など、改善すべき点が存在する。そこで、一連の操作を自動化することにより省力化が図れ、かつ危険な作業から回避できるものと考え、プランクトンの自動検査装置の開発を立案した。

3. 研究の方法

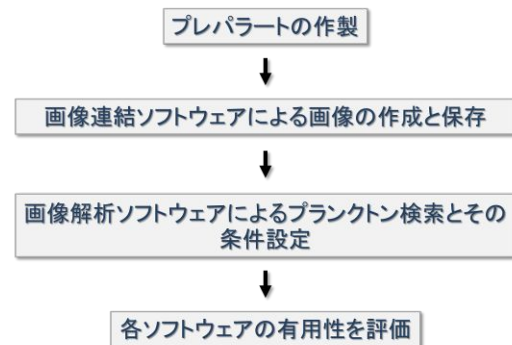
壊機法によるプランクトン検査の3つの過程について自動装置を導入し、自動プランクトン検査システムを構築する。1)壊機処理については、加熱した試料にパーソナルコンピュータ制御できる定量流量ポンプを使い発煙硝酸ならびに硫酸を注入する自動壊機装置を開発する。2)壊機後の試料の酸除去および試料の濃縮についても遠心分離機あるいは濾過膜を利用する自動洗浄装置を開発する。3)最終段階のプランクトンの検索については、パーソナルコンピュータにより制御できる可動ステージならびにデジタルカメラを備えた顕微鏡を用い、画像連結ソフトウェアにより全視野の情報を収集、次いで画像解析・計測ソフトウェアにより自動プラ

ンクトン検索・分類を行う装置を開発する。

4. 研究成果

本研究では、プランクトンの自動検索システムについて特に有益な結果が得られた。その自動検索システムに関しては市販されている画像連結ソフトウェア e-Tiling[®]、画像解析・計測ソフトウェア WinROOF[®]を導入し、それらの有用性を検討した(図1)。採用の主たる理由は類似の製品とすると比較的廉価であることからである。今回の検討からそれぞれのソフトウェアの導入による効果、問題となる点、今後の検討すべき課題を明らかにすることができた。

検討の概要



プレパラートの作製

河川水を、ホットプレート上で発煙硝酸により壊機後、エタノールによる懸濁液を調製し、その1滴をカバーガラス(18×18mm)に滴下、乾燥後、マウントメディア(和光純薬)により封入しプレパラート作製。

画像連結ソフトウェア

e-Tiling[®](MITANI)を用いた。なお、顕微鏡(Nikon ECLIPSE 50i)には電動ステージ(ProScan[®] H101, Prior)を装着し、e-Tiling[®]から操作できるように改造。

画像解析・計測ソフトウェア

WinROOF[®](MITANI)を用いた。

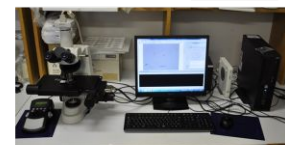
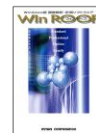


図1. 検討の概要、プレパラート作製、ソフトウェアについて

(1)e-Tiling[®]に関して:e-Tiling[®]の操作方法の概要を図2に、導入の効果、問題点、今後の検討課題を図3に一覧する。プレパラート標本を一枚の画像として取り込み電子データとして保存できることがまず挙げられる(図4)。電子データのためプレパラート標本よりも長期保存できる。さらにはフォーカス(Z軸)に違いのあるプランクトンも3次元画像を2次元画像に変換することで同じ画面上に取り込むことができる点が挙げられる。現ソフトウェアではファイル容量が350MBと制限されているため1枚のプレパラート標本の全情報を高解像度の画像として保存ができないが、コンピュータ機能の向上により将来は改善されていくものと思われる。コンピュータのフリーズの解消、取り込

み時間の実用レベルまでの短縮も改善が期待される。現ソフトウェアでも操作は煩雑であるが1枚のプレパラートを4分割して取り込むなどの工夫を行えば高解像度の画像の保存は可能である。本ソフトウェアは、病理組織標本あるいは工業製品や材料などの分野での利用を想定し開発されたものではあるが、プランクトン検査においても実用性のあるソフトウェアと考えられた。プランクトン検査のためには1枚のプレパラート標本を対物レンズ 40 倍の解像度で取り込み可能な性能を備えたものとなることが期待される。

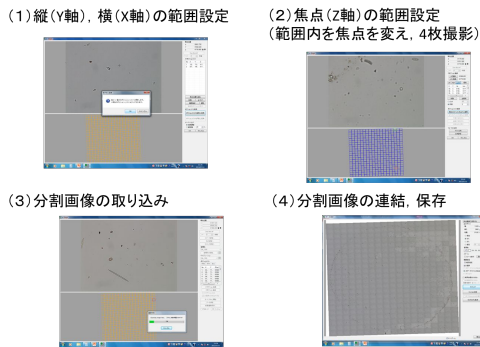


図 2. e-Tiling®の操作手順

*** 効果**

- ①プレパラートを1枚の画像にできる
- ②三次元画像情報を二次元画像に自動変換できる
- ③デジタルデータとして画像を保存できる

*** 問題点**

- ①取り込みに時間がかかる
- ②Z軸上の位置の違いによって取り込めないものがある
- ③ファイルの容量が大きくなるため、解像度の低下を伴う圧縮が必要になる
- ④作業量が大きいためフリーズが頻発する

*** 今後の検討課題**

- ①連結画像の高解像度化
- ②取り込み時間の短縮化

図 3. e-Tiling®導入の効果,問題点,今後の検討課題.

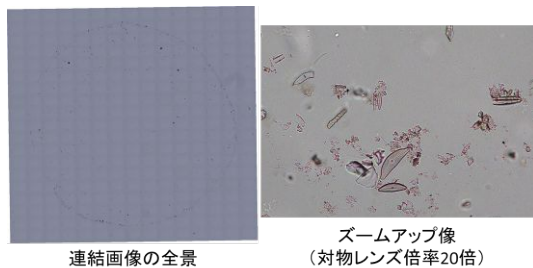
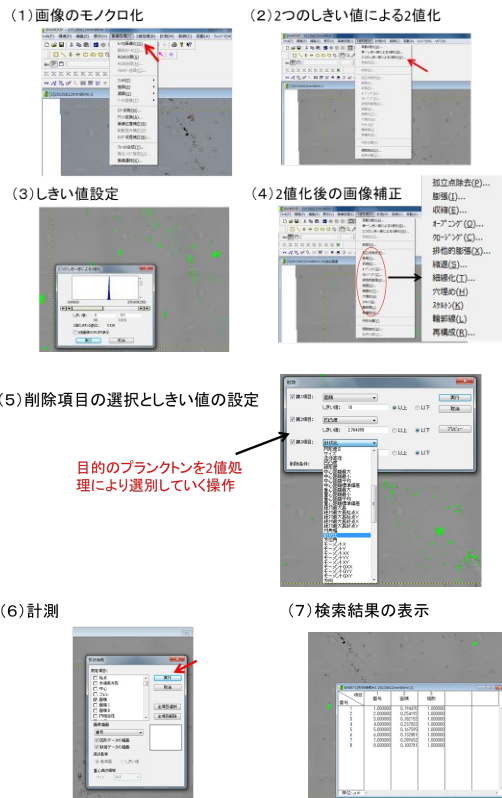


図 4. e-Tiling®による連結画像例

(2)WinROOF®に関して: WinROOF®の操作法の概要ならびに検索結果の確認法を図 5a および b に、導入の効果,問題点,今後の検討課題を図 6 に一覧する。形態特徴を認識する機

(a) 操作手順



(b) 検索結果の確認法

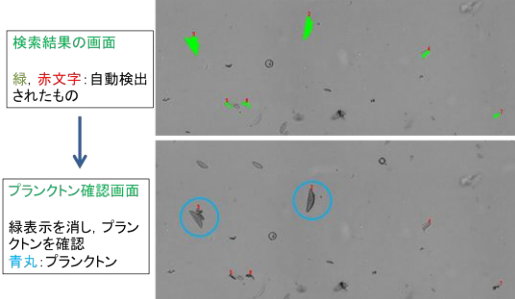


図 5. WinROOF®の操作手順(a)と検索結果の確認法(b)

*** 効果**

- ①検索が瞬時に行える
- ②検索パターンが豊富
- ③微細珪藻でも検出可能
- ④細かい検出条件の設定が可能

*** 問題点**

- ①プランクトン以外のものとの識別が困難
- ②プランクトンが重なったものとの識別が困難
- ③方形など形によって検索に困難なものがある
- ④プランクトンの種属分類ができない
- ⑤バルサム系封入剤では検出されない

*** 今後の検討課題**

- ①識別能の高いプログラム設定
- ②プランクトンの種属分類・同定

図 6. WinROOF®導入の効果,問題点,課題.

表1 プラנקトンの検索結果とその正誤

良く検出された例

プラנקトン	実数*	測定数**	正***	誤****
円形	3	3	3	0
舟形	11	10	8	2
方形	11	8	5	3
計	25	21	16	5

あまり検出されなかった例

プラנקトン	実数*	測定数**	正***	誤****
円形	10	3	0	3
舟形	5	2	1	1
方形	3	7	3	4
計	18	12	4	8

*肉眼的に観察した値

**WinRoof[®]による自動計測値

***自動計測値の内、正しく検出されたものの数

****自動計測値の内、プラנקトン以外のものの数

能を備えていないため2値処理の機能により検索を試みた。プラנקトン検査のためには形状別(円形, 舟形, 方形)に2値処理による検索条件を詳細に調整して用いるのが最良の方法と考えられた(図7a)。

しかし, WinROOF[®]による検索と肉眼による観察とはかなりの乖離がみられ, 識別能は十分とはいえなかった(図7b, 表1)。原因としてプラנקトン以外の固形物による妨害ならびにプラנקトン同士が重なり合ったものなどとの識別が困難なことなどが挙げられる。実務においては大半を占めるプラנקトン以外の固形物の中から少数混在するプラנקトンを探し出すという作業なので是非とも解決されなければならない問題である。病理組織標本で用いられているバルサム系の封入剤では珪藻と背景とのコントラストが低いために検出されないプラנקトンが多数みられたが, 珪藻観察用に調製された高屈折率の封入剤マウントメディア[®](和光純薬)を用いることで改善された。本ソフトウェアは, 解析機能として形状(円形度, 楕円長短比など)ならびに色彩(赤色, 青色など)によるものは備えているが, 珪藻の種属を識別するために必要な殻面の紋様などのような形態を認識する機能はない。オプション機能として針状分離計測の機能が用意されているがこの機能も2値処理機能に基づくものである。近年, 珪藻の微細な形態あるいは殻面の紋様などを識別する方法も考案されている。実務においては珪藻断片も対象となることから紋様認識機能を備えたものとなることが望まれる。本ソフトウェアによる検索・計測作業は, 正確性は低いものの瞬時に完了することから, プラנקトンらしきものを拾い上げるスクリーニング的利用は十分考えられる。

今回, 市販ソフトウェア e-Tiling[®]ならびに WinROOF[®]の溺死診断のためのプラנקトン

(a) 条件設定

円形



舟形



方形



1. 画像ファイル取り込み

2. 画像処理→モノクロ化

3. 長方形ROI (Region Of Interest) により範囲指定

4. 2値処理→2つのしきい値による2値化(しきい値0-121)

5. 2値処理→クローゼング

6. 2値処理→穴埋め

7. 2値処理→削除(楕円長短比: しきい値0.5以上)

8. 2値処理→削除(楕円長短比: しきい値0.06以下)

9. 2値処理→削除(円形度: しきい値0.5以上)

10. 2値処理→削除(重心距離標準偏差: しきい値0.05以下)

11. 2値処理→削除(収縮率: しきい値10以上)

12. 計測→形状特徴(測定項目: 面積)

13. ファイル保存

1. 画像ファイル取り込み

2. 画像処理→モノクロ化

3. 長方形ROI (Region Of Interest) により範囲指定

4. 2値処理→2つのしきい値による2値化(しきい値0-132)

5. 2値処理→クローゼング

6. 2値処理→穴埋め

7. 2値処理→オープニング

8. 2値処理→削除(円形度: しきい値0.7以上)

9. 2値処理→削除(円形度: しきい値0.5以下)

10. 2値処理→削除(収縮率: しきい値6以上)

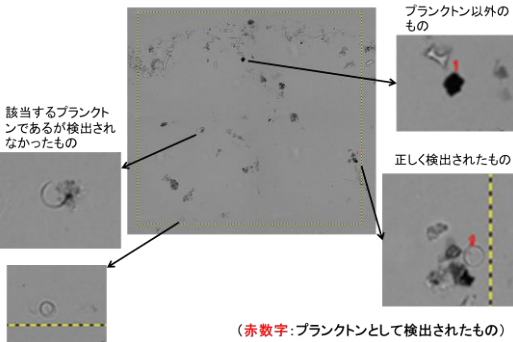
11. 2値処理→削除(面積: しきい値0.1以下)

12. 計測→形状特徴(測定項目: 面積)

13. ファイル保存

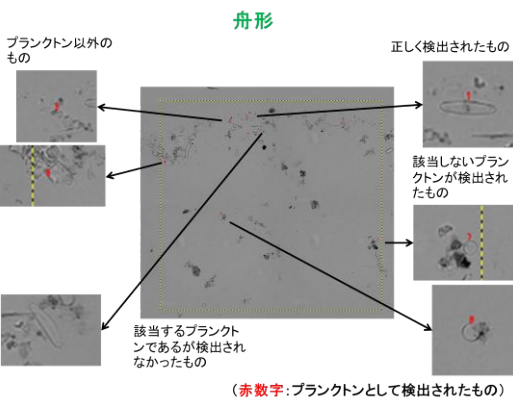
(b) 検索結果

円形



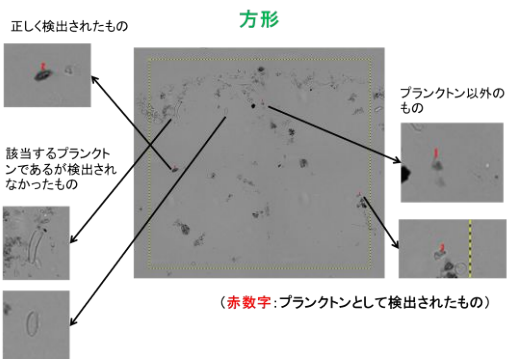
(赤数字: プラנקトンとして検出されたもの)

舟形



(赤数字: プラנקトンとして検出されたもの)

方形



(赤数字: プラנקトンとして検出されたもの)

図7 WinRoof[®]の条件設定(a)と検索結果(b)

検査における有用性を検討し、いずれのソフトウェアもある程度評価できる結果を得た。本研究がプランクトン検査に特化したプログラムの開発につながることを希求する。

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2件)

1. Takahito Hayashi, Eri Higo, Hideki Orito, Kazutoshi Ago, Mamoru Ogata. Postmortem wounds caused by cookie-cutter shark (*Isistius species*): an autopsy case of a drowning victim. Forensic Sci Med Pathol, Published online: 13 August 2014. 査読有り

2. 吉野直明, 林 敬人, 吾郷一利, 吾郷美保子, 小片 守. ダルマザメの咬傷と思われる類円形あるいは類楕円形の損傷を認めた溺死体の1剖検例. 法医学の実際と研究 56巻, 193-197, 2013. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

1. 吾郷一利, 林 敬人, 中前琢磨, 小片 守. 画像連結ならびに画像解析ソフトウェアを用いたプランクトン検索自動化の試み. 第99次日本法医学会学術全国集会, 高知市, 2015年6月(発表採択済み).

2. 吾郷一利, 隈元健吾, 桑山紗也華, 田代侑馬, 田村誠也, 原口めぐみ, 林 敬人, 小片 守. 溺死診断のためのプランクトン検査自動化の試み - 画像解析による珪藻検索 -. 第64回日本法医学会学術九州地方集会, 鹿児島市, 2014年10月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吾郷 一利 (AGO KAZUTOSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 20102056

(2)研究分担者

(なし)

研究者番号:

(3)連携研究者

(なし)

研究者番号: