

食道がんの HE 染色画像からのバーチャル免疫染色画像生成

田中敏幸[†] 高橋良輔[†] 坂下慎吾[‡] 石井源一郎[‡]
[†]慶應義塾大学 理工学部 [‡]国立がん研究センター

キーワード：食道がん、HE 染色、バーチャル免疫染色、画像処理

1 はじめに

病理医によるがんの診断は患者の身体から採取した検体を染色することで行われる。まず、検体に対して HE 染色を行なった結果に対して、癌の診断を行い、治療方針を決定する。診断が難しい場合には、隣接切片に対して免疫染色を行い、その結果からがんの治療方針を決定する。免疫染色にはいくつかの種類があり、1 種類の免疫染色で判断ができない場合には、複数の免疫染色を行う。そのような状況のため、免疫染色が必要となった場合には、多くの時間と診療コストが必要となる。また、免疫染色を行うたびに隣接切片を消費してしまうので、その後の治療を考えると望ましいことではない。そこで、HE 染色画像を基にして画像処理によって免疫染色と同様の染色を行う、バーチャル免疫染色が期待されている[1][2]。

同様の研究として、教師なし深層学習を基盤とした機械学習[3]による細胞組織の仮想的な染色が試されている。しかしその研究では、HE 染色を行ったスライス切片を洗浄して、同一切片に免疫染色を行った画像を学習データとして利用している。病理検査の現状では、同一のスライス切片に異なる染色を行うことは、病理医の負担が非常に多くなるという問題点がある。また、多くの組織からそのようなデータを少しずつ集めた場合、組織ごとに染色状況が異なるため、機械学習のデータとしては予期せぬ結果が出る可能性がある。

そこで本研究では、隣接切片に対して HE 染色画像と免疫染色画像を行った場合のバーチャル免疫染色の可能性を追求することとした。隣接切片を利用するため、形状の違いおよび位置のずれの影響を考慮しなければならない。そこで、染色領域の色空間情報および形状情報を利用した位置合

わせの後で、機械学習を用いた方法と画像処理を用いた方法を提案する。ここでは、研究対象として、AE1/AE3, Desmin の 2 種類に対するバーチャル免疫染色画像の生成を目指す。

2 方法

2.1 本研究で用いる画像

以下の Fig. 1~Fig. 3 に本研究で用いた HE 染色画像と AE1/AE3 および Desmin の 2 種類の免疫染色画像を示す。画像は NanoZoomer [6] によってスキャンされており、解像度は 226 nm/pixel、取得時のレンズ倍率は 40 倍である。画像サイズは HE 染色画像が 28875×3929 pixel、Desmin 免疫染色画像が 27394×2850 pixel、AE1/AE3 免疫染色画像が 28347×2797 pixel である。



Fig. 1 HE 染色画像



Fig. 2 免疫染色画像 (AE1/AE3)



Fig. 3 免疫染色画像 (Desmin)

2.2 提案手法

本研究で扱う免疫染色画像において、AE1/AE3 により染色される領域は比較的大きな領域で染色され、Desmin は比較的小さな領域が染色されるという特徴がある。そのため、同一のアルゴリズム

を使ってバーチャル免疫染色を行うことができない。本稿で利用する、AE1/AE3 に対する手法の概略を Fig. 4 に、Desmin に対する手法の概略を Fig. 5 に示す。提案手法では、HE 染色画像の RGB 値による色情報を利用し、染色領域の推定を行う。

(1) AE1/AE3 に対する手法

AE1/AE3 によって染色される領域は、細胞核が密集している傾向にある。その情報を利用するため、スーパーピクセル[4]を利用して、領域内の平均画素値によって、背景領域、染色領域、非染色領域の3分類を行う。ラベリングや閾値処理を用い、最後にマスク画像を利用して染色領域を推定する。

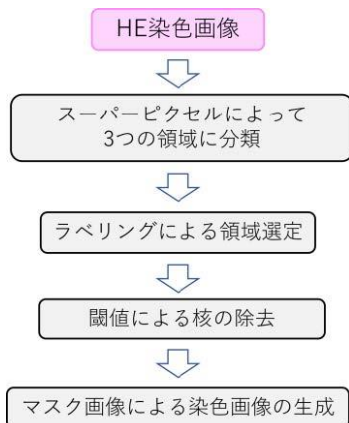


Fig. 4 色情報による画像生成手順

(2) Desmin に対する手法

Desmin に対する手法では、はじめに I.染色領域、II.非染色領域における細胞核領域、III.非染色領域の細胞核以外の領域において、任意に 100 点ずつを取得して、HSV 成分画像のヒストグラムを作成する。ヒストグラムに基づいた閾値設定、穴埋め処理によるノイズ除去の後、スーパーピクセルを用いて染色領域の推定を行う。

2.3 GAN による学習・画像生成

(1) GAN のための前処理の概要

提案手法との比較として、深層学習を用いて HE 染色と免疫染色の組を学習させて、免疫染色画像を生成する方法を示す。深層学習のアルゴリズムとしては、敵対的生成ネットワーク (GAN) [5][6]

を利用する。Fig. 6 に示すように、隣接切片に対して HE 染色画像と免疫染色画像を行った画像を用意する。それらの画像の対象領域の位置合わせを行い、各画像の同一位置から 1024×1024 pixel のサイズのパッチを切り出す。前処理として、背景領域の画像を取り除き、GAN による学習を行う。

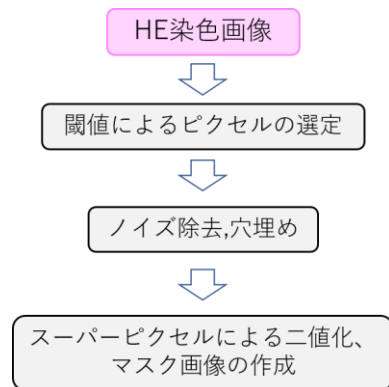


Fig. 5 色情報による画像生成手順

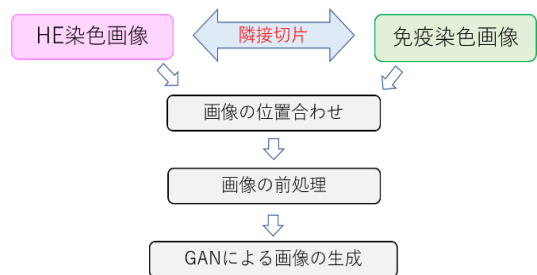


Fig. 6 GAN による画像の生成手順

(2) 画像の位置合わせ

HE 画像とその隣接切片における免疫染色画像は検体の隣接切片に対して染色を行ったものであり、位置や形状が完全に一致することはない。そのため、相互情報量と呼ばれる画像の類似度を示す指標を導入し、その相互情報量が最大になるように画像の変換を行う。画像の変換には拡大・縮小、平行移動、回転を行列変換により行うアフィン変換を用いる。

(3) GAN による学習・画像生成

本研究では、AE1/AE3 で 52 枚、Desmin で 50 枚の画像データセットを利用し、学習データとテストデータを 8:2 の割合で分けて学習を行う。GAN

にはいろいろなモデルがあるが、ここでは pix2pix [7]-[9]を用いる。

3 結果・考察

3.1 提案手法の生成結果

バーチャル免疫染色を行った結果を、Fig. 7, Fig. 8 に示す。Fig. 7 の AE1/AE3 の結果においては、大まかな染色位置は推定が可能であるが、生成画像はぼやけたものとなった。Fig. 8 の Desmin の結果においては、染色位置の推定に失敗している。

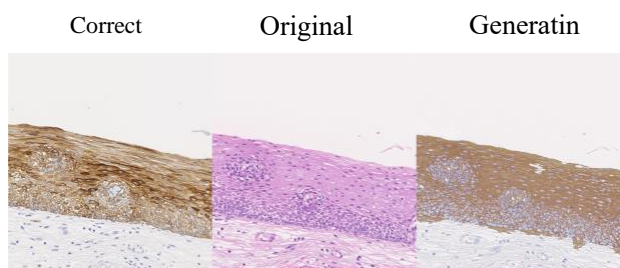


Fig. 7 Example of images generated by RGB (AE1/AE3)

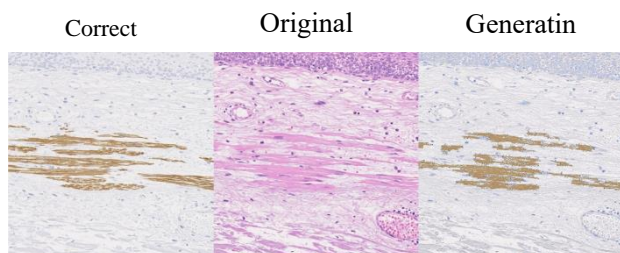


Fig. 8 Example of images generated by RGB (Desmin)

3.2 GAN による生成結果

Fig. 9 に GAN (pix2pix) を用いてバーチャル免疫染色を行った例を示す。ここでは、Desmin の場合を示している。一番上の段が入力画像、二段目が pix2pix によるバーチャル免疫染色画像、三段目が実際に隣接切片を免疫染色した画像となっている。二段目と三段目の染色結果を一致させることが本研究の目標となっている。

図を見てわかるように、pix2pix によるバーチャル免疫染色では、わずかに染色されている部分はあるが、実際とはかなり違っている。大きな理由として、pix2pix は画素ごとの対応関係を学習するシステムであるのに対して、隣接切片では画素レベルでの位置対応ができていないため、学習精度

が悪くなっていることがあげられる。また、バーチャル免疫染色の失敗領域として、欠陥が多かったことがあり、欠陥の形状特徴を考慮して、楕円形の領域をサイズを考慮して削除した。それによって余分な領域の抽出がなくなった半面、染色領域が少なくなってしまった。

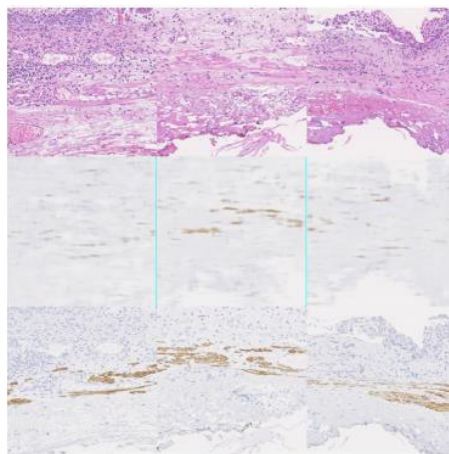


Fig. 9 Example of image generated by GAN (Desmin)

4 おわりに

本研究では、提案手法として色情報および形状情報を利用した Desmin および AE1/AE3 におけるバーチャル免疫染色画像の作成を行った。Desmin では、HSV, L*a*b*, YCbCr の 3 種類の色空間で染色領域の推定を行った。はじめにヒストグラムから設定した閾値で pixel の選定を行い、モルフォロジー変換、スーパーピクセル、ラベリングを利用してノイズの除去を行った。その後、色情報のみで取り除くことの難しい血管領域について、各領域に対して輪郭検出および楕円の近似を行い、形状を評価することで削除を行った。推定した染色領域に対して色変換を行うことで画像の生成を行った。AE1/AE3 では、pixel 単位での色情報の違いが見られず、領域単位での色情報の違いが見られたため、スーパーピクセルによる領域の 3 分類を行った。分類した領域に対して領域の色情報およびラベリングによって染色領域の推定を行い、色変換によって画像の生成を行った。

また、GAN (pix2pix) と呼ばれる機械学習アルゴリズムを用いて画像の生成を行った。データセットとして HE 染色画像と隣接切片の免疫染色画

像の位置合わせを行い、対応する領域をペアで学習させることで画像の生成を行った。

生成画像の精度の評価は病理医の評価を基に行った。提案手法ではDesminにおいてはHSV色空間で作成したものが総合的な評価は高い結果であった。比較手法では、Desminにおいては染色領域が小さいために、HE染色画像と免疫染色画像の形状の違い、位置のずれの影響を受けやすく、理想的な学習を行うことができず、染色領域の推定には失敗しているといえる。AE1/AE3では染色領域が大きいため、一定の染色領域の推定が可能であった。また、提案手法と比較手法では、Desminにおいては提案手法の方が染色領域の推定精度が高く、AE1/AE3においては比較手法の方が高い結果であった。

参考文献

- [1] 藤谷真之, 望月義彦, 飯塚里志, シモセラエドガー, 石川博, “病理画像の自動染色変換”, 情報処理学会技術研究報告, Vol.2017-CVIM-207, No.29, pp. 1-8 (2017).
- [2] Z. Xu, *et al.*, “GAN-based Virtual Re-Staining: A Promising Solution for Whole Slide Image Analysis”, arXiv:1901.04059v1 (2019).
- [3] Ronneberger, P. Fischer, T. Brox, "U-net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation.", International Conference on Medical Image Computing and Computer-assisted Intervention, Springer, Cham, pp. 234-241, (2015).
- [4] R. Achanta, A. Shaji, K. Smith, A. Lucchi, P. Fua, S. Susstrunk, “SLIC Superpixels.”, EPFL Technical Report, No.149300, (2010).
- [5] D. Mattes, H. Vesselle, T. Lewellen, W. Eubank, *et al.*, “Non-rigid multimodality image registration”, Medical Imaging 2001: Image Proceedings. SPIE Publications, pp.1609-1620 (2001).
- [6] M. Styner, C. Brechbuehler, *et al.*, ”Parametric estimate of intensity inhomogeneities applied to MRI”, IEEE Transactions on Medical Imaging, Vol. 19, pp.153-165 (2000).
- [7] Goodfellow, *et al.*, “Generative adversarial nets” NIPS, Proceedings of the 27th International Conference on Neural Information Processing Systems, pp2672-2680 (2014).
- [8] M. Mirza, S. Osindero, “Conditional Generative Adversarial Nets”, arXiv:1411.1784v1 (2014).
- [9] P. Isora, *et al.*, “Image-to-Image Translation with Conditional Adversarial Networks”, Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, pp. 1125-1134 (2017).