

大腸癌進行状況確認システムの開発 — 基底膜の抽出方法の検討 —

Development of Software for the Judgment of the Degree of Tumor Differentiation of Colon Cancer — Study of the Trimming of Basement Membrane —

岡崎 明彦 長嶺 共全 小野謙三
Akihiko Okazaki Tomomasa Nagamine Kenzou Ono

1. はじめに

細胞が新生物を形成した塊を腫瘍と呼ぶ。腫瘍には良性と悪性の2種類があり、前者を腺腫、後者を癌（癌腫）と呼んでいる。良性腫瘍と悪性腫瘍の区別は、現在のところほとんどの場合、形態学的な診断に頼っている。つまり、顕微鏡を使って人の組織の薄切りを観察し、湿潤性増殖の有無、異型度（癌細胞の悪性度）、分化度（癌細胞の成熟の度合い）および極性（細胞の秩序だった配列）などによって悪性か良性かを判断しているのである^{1), 2)}。しかし、異型度および分化度に関する明確な指標がないため、判定結果には人為的誤差や測定誤差が含まれる。

著者らは、近年死亡率が増加している大腸癌を研究対象として、分化の喪失に伴って細胞核や腺腔の形や大きさにばらつきが増える多形成に着目し、細胞核クラスターと腺腔のフラクタル特性に基づく分化度指標（フラクタル次元、サイズ分布指数、ランク分布指数）、基底膜と細胞核の位置関係や基底膜と腺腔の位置関係に基づく分化度指標、および基底膜を輪郭とする領域、基底膜近傍の細胞核によって形成される領域ならびに腺腔の各円形度に基づく分化度指標に関する判定基準を作成するとともに³⁾、大腸癌の進行状況を的確に判定できる操作性に優れた大腸癌進行状況確認システムの開発を行ってきた⁴⁾。

開発中のシステムは、大腸組織の顕微鏡写真を取り込み、基底膜、腺腔、核などを抽出する画像入力部、フラクタル次元、サイズ分布指数、ランク分布指数、円形度等を算出する分化度解析部、および進行状況の判定する判別分析部から構成されている。腺腔と核クラスターを精度

よく抽出するため、画像入力部では顕微鏡写真から基底膜外の画像を除去した後、基底膜内の画像を対象にヒストグラムを作成し、画像の2値化を実行している。

本研究では、基底膜外の画像除去の操作性と腺腔および核クラスターの抽出精度の向上を目的として、フィルタリング処理と輪郭線抽出に基づく基底膜の判定を試みた。

2. 大腸癌進行状況確認システム

大腸は管腔臓器であり、図1に示すような構造をしている⁵⁾。内側の表面に粘膜層、その下に粘膜下層、さらにその下に筋肉層があり、漿膜で外側を覆っている。粘膜の一番深い部分に

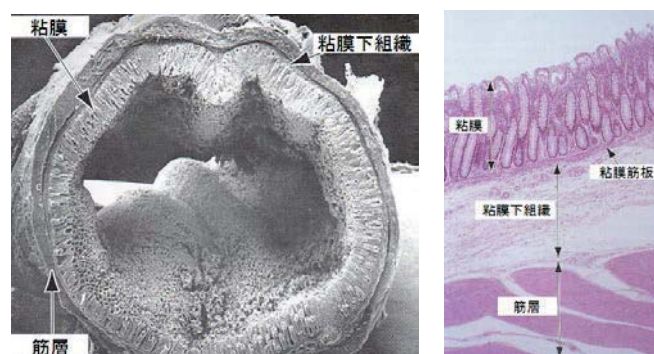


図1 大腸の構造

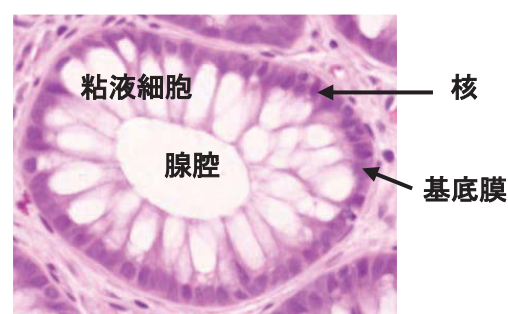


図2 正常な大腸粘膜組織

は、細胞分裂を行って新たな細胞を作り出す幹細胞が存在し、新しく作り出された細胞はさらに新しく作り出された細胞によって外側へ押し出されながら成熟する。成熟した粘膜細胞は表面から剥がれ落ちていき、新しい細胞と入れ替わる。この入れ替わりによって粘膜の状態が保たれるのであるが、分裂した細胞の形態や行動が変化して、細胞独自の機能をもつようになることがある。これを”分化する”と言い、腫瘍では、分化の喪失に伴って細胞形態の異型性を示すことが知られている⁵⁾。図2は分化度判定に用いる大腸組織(顕微鏡写真)の一例である。

開発中の大腸癌進行状況確認システムは、以下に示すように、画像入力部、分化度解析部および判別分析部から構成されている。

(1) 画像入力部

- ・ 顕微鏡写真の取り込み
- ・ フィルタリング処理
- ・ ヒストグラム作成
- ・ エッジ(輪郭線)抽出
- ・ 2値化
- ・ 細線化
- ・ 腺腔、核クラスター、基底膜の抽出

(2) 分化度解析部

- ・ 腺腔のフラクタル次元と形状係数の解析
- ・ 核クラスターのサイズ分布指数とランク分布指数の解析
- ・ 基底膜の形状係数の解析

(3) 判別分析部

- ・ マハラノビス距離に基づく重判別分析

3. フィルタリング処理^{6), 7)}

読み込んだ顕微鏡写真(以下、「画像」という。)がボケていたり、ノイズがのっていると基底膜内の画像を正確に抽出することが困難になる。そのような画像からでも基底膜の輪郭線を正確に抽出するために、入力画像に対してフィルタリング処理を行う。

画像処理において入力画像に対応する画素値だけではなく、その周囲の画素も含めた領域内の画素値を用いて計算する処理を空間フィルタリングと呼ぶ。空間フィルタは線形フィルタと非線形フィルタに大別されるが、今回使用するのは線形フィルタのみである。基本的な線形フィルタ

の演算は、 3×3 画素で係数 $k(i, j)$ と入力画素値 $f(x, y)$ の積和演算を行うもので、出力画素値 $g(x, y)$ は次式で与えられる。

$$g(x, y) = \sum_{j=-1}^1 \sum_{i=-1}^1 k(i, j) f(x + i, y + j) \quad (1)$$

3.1 平滑化フィルタ

画像に対してなめらかな濃淡変化を与える処理を平滑化と呼ぶ。平滑化は画像に含まれるノイズなどの不要な濃淡変化の軽減にも用いられている。作成した 3×3 画素の平滑化フィルタを図3に示す。

1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9
1/9	1/9	1/9

図3 3×3 の平滑化フィルタ

3.2 メディアンフィルタ

平滑化フィルタによって画像に含まれるノイズを軽減することができるが、もともとのエッジも滑らかにしてしまうため、ボケた画像になる。メディアンフィルタでは、ボケを抑えつつノイズを取り除くことができる。平滑化フィルタは画素値の平均を求めるのに対し、メディアンフィルタは領域内の中央値(メディアン)を出力するため、入力画像のエッジがあまり影響されずに、スパイクノイズがきれいに除去される。

3.3 鮮鋭化フィルタ

平滑化フィルタが滑らかな濃淡変化を画像に与える処理であるのに対し、鮮鋭化フィルタは濃淡の変化を強調することで、鮮明な画像を得ることができる。この処理を画像の鮮鋭化と呼ぶ。入力画像の2次微分であるラプラシアンフィルタによる結果を差し引くと、エッジの両側で明るい部分はより明るく、暗い部分はより暗くなり、エッジの傾斜が急になる。その結果、エッジが鮮鋭化された画像が得られる。図4にそのような処理を行う鮮鋭化フィルタを示す。

0	-1	0
-1	5	-1
0	-1	0

図4 鮮鋭化フィルタ

4. ヒストグラムの拡張（線形変換）⁷⁾

読み込んだ画像に対してフィルタリング処理を行った後、画像をグレースケールに変換し、ヒストグラムを作成する。輝度の分布が偏ってしまうとコントラストが低くなり、画像が全体的に暗くなってしまう。ヒストグラムの拡張とは、コントラストを拡張してメリハリのついた見やすい画像に変換することである。

ヒストグラムの線形変換は、画像の中の最小の画素値を f_{min} 、最大の画素値を f_{max} とし、次式によって任意の画素値 f を g に変換する。

$$g = 255 \times \frac{f - f_{min}}{f_{max} - f_{min}} \quad (2)$$

5. エッジ抽出⁷⁾

画像中の濃淡値が急激に変化する部分をエッジ（輪郭線）として取り出す処理をエッジ抽出と呼ぶ。

5.1 1次微分（グラディエント）

デジタル画像では、微分演算は差分演算として置き換えられる。 x 方向、 y 方向の微分（差分）をとることにより、 x 、 y 方向の輪郭を抽出する。 x 方向のフィルタ係数は図5、 y 方向のフィルタ係数は図6のようになる。

0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	-1	1	-1	1	0	-1/2	0	1/2
0	0	0	0	0	0	0	0	0

図5 1次微分のフィルタ係数（ x 方向）

0	1	0	0	0	0	0	1/2	0
0	-1	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	-1	0	0	-1/2	0

図6 1次微分のフィルタ係数（ y 方向）

各画素における x 方向の差分を $\Delta_x f(i, j)$ 、 y 方向の差分を $\Delta_y f(i, j)$ とすると、勾配の大きさは式(3)、勾配の方向は式(4)で表される。

$$\sqrt{(\Delta_x f(i, j))^2 + (\Delta_y f(i, j))^2} \quad (3)$$

$$\tan^{-1} \frac{\Delta_y f(i, j)}{\Delta_x f(i, j)} \quad (4)$$

一方、斜め方向の差分を取る Roberts オペレータ（図7）は、斜め方向のエッジ抽出に適している。

0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1
0	0	-1	0	-1	0

図7 グラディエントの計算に用いるオペレータ（Roberts オペレータ）

5.2 2次微分とラプラシアンフィルタ

図5(a)、(b)と図6(a)、(b)に示した2つの1次微分フィルタ（図(a)、(b)）を組み合わせ、差分をとることで、図8(a)、(b)に示すような x 方向と y 方向の2次微分フィルタの係数が得られる。

さらに x 方向と y 方向の2次微分フィルタの和をとると、 x 、 y 両方向に対して2次微分フィルタ処理を行うラプラシアンフィルタを得ることができる。図9がラプラシアンフィルタの係数である。

0	0	0	0	1	0
1	-2	1	0	-2	0
0	0	0	0	1	0

(a) x方向

(b) y方向

図8 2次微分のフィルタ係数

0	1	0
1	-4	1
0	1	0

図9 ラプラシアンフィルタの係数

5.3 テンプレートマッチングを用いた輪郭線抽出

テンプレートマッチングを使用した輪郭線の抽出方法として Prewitt の方法がある。Prewitt の方法は、エッジの方向に対応する 8 種類のマスクを用意し、入力画像の画素とその周辺の領域画素にマスクの値を乗じて和をとることで、一致の度合いを計算し、最大の差分値をエッジの強さとする方法である。

1 1 1 1 -2 1 -1 -1 -1	1 1 1 1 -2 -1 1 -1 -1	1 1 -1 1 -2 -1 1 1 -1	1 -1 -1 1 -2 -1 1 1 1
-1 -1 -1 1 -2 1 1 1 1	-1 -1 1 -1 -2 1 1 1 1	-1 1 1 -1 -2 1 -1 1 1	1 1 1 -1 -2 1 -1 -1 1

図10 テンプレートマッチングに用いるマスク群 (Prewitt オペレータ)

6. 細線化⁷⁾

2 値化された画像において、幅が不揃いである輪郭線の中心 1 画素分だけを残すように線を細くする処理を細線化と呼ぶ。細線化のアルゴリズムには Hilditch の方法、田村の方法、Zhang Suen の方法などがある。本研究では、判別分析法によって画像を 2 値化した後、Hilditch の方法を用いて細線化処理を行った。なお、細線化処理は連結性を保ちながら削れる画素を削っていく処理であり、輪郭線を損わずに削っていく必要がある。

7. 結果と考察

大腸の正常な粘膜組織は、分化の喪失に伴って、大腸良性腫瘍組織（腺腫）、高分化の悪性腫瘍組織、中分化の悪性腫瘍組織および低分化の悪性腫瘍組織へと変化していく。

大腸癌は進行するにつれて細胞の形を留めなくなってしまうため、本研究では、正常細胞と腺腫細胞の画像に対して 1 次微分、2 次微分、テンプレートマッチングによる基底膜の輪郭線の抽出を試みた。

7.1 正常細胞

正常細胞の画像に対して 1 次微分、2 次微分、テンプレートマッチングによる輪郭線の抽出を行った結果を図 11 に示す。

次に得られた画像を 2 値化した後、細線化処理を行った（図 12）。ただし 2 次微分は輪郭の強さのみを求めるため、細線化処理を行わなかった。

図 12(a) と図 12(b) を比較すると、1 次微分の細線化処理よりもテンプレートマッチングの細線化処理のほうが基底膜がはっきりとしている。どちらも基底膜を目視できるが、ノイズが多く輪郭線を抽出したとはいえない。

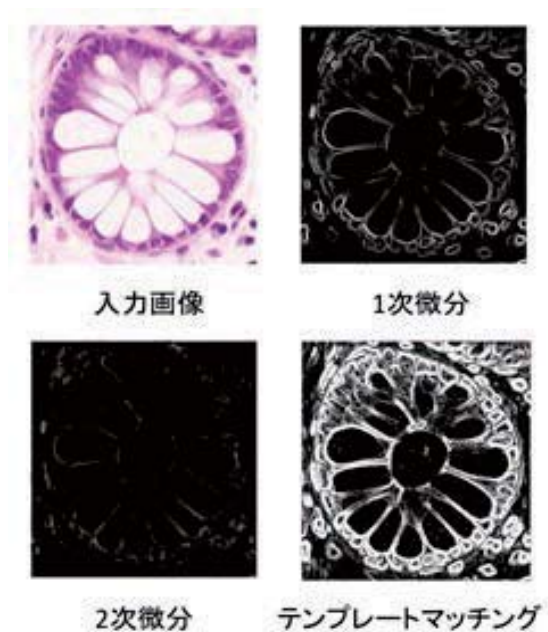


図 11 正常細胞の輪郭線抽出

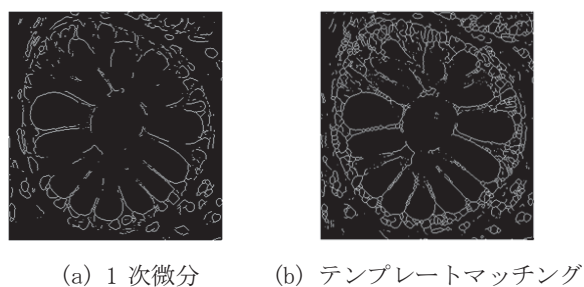


図 12 細線化

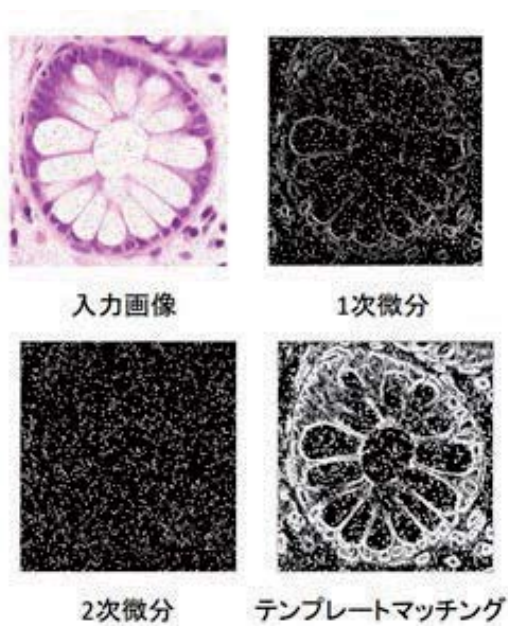
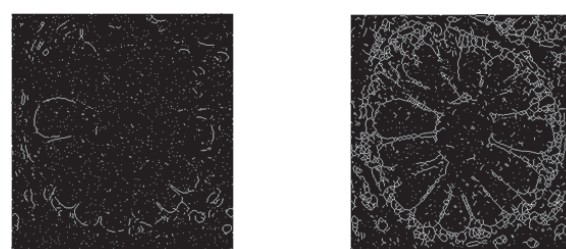


図 13 ノイズのかかった正常細胞の輪郭線抽出

7.1.1 ノイズがかかった正常細胞の基底膜の抽出

ノイズがかかった場合の正常細胞の基底膜の抽出を行った。ノイズが付与された画像に対して1次微分, 2次微分, テンプレートマッチングを行った結果を図13に示す。

図13の1次微分とテンプレートマッチングの画像を2値化した後, 細線化処理を行った結果を図14に示す。



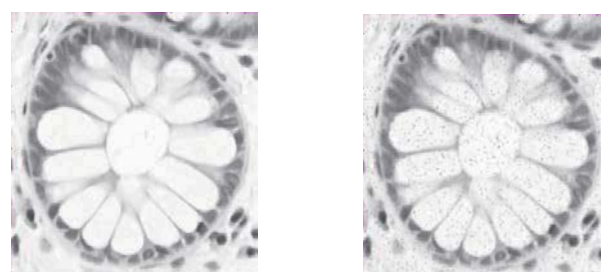
(a) 1次微分 (b) テンプレートマッチング

図 14 細線化

入力画像に対してスパイクノイズがのると, 1次微分, テンプレートマッチングによる細線化ともにノイズが拡がり, はっきりとした基底膜を抽出できなくなった。とくに1次微分では, 原型を留めなくなってしまっている。

次に, ノイズがかかった正常細胞画像に対して平滑化フィルタをかけた結果を図15(a)に, メディアンフィルタをかけた結果を図15(b)に示す。

平滑化フィルタをかけた結果(図15(a))とメディアンフィルタをかけた結果(図15(b))に対して1次微分, 2次微分, テンプレートマッチングによる輪郭線抽出を行った(図16, 17)。



(a) 平滑化フィルタ (b) メディアンフィルタ

図 15 ノイズの除去

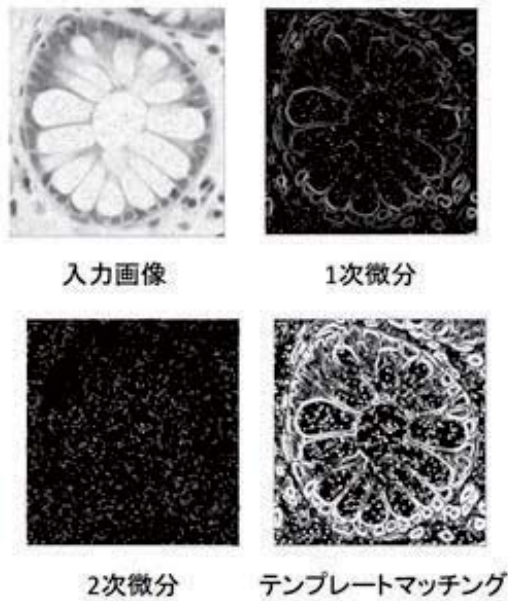


図 16 平滑化フィルタをかけた
正常細胞の輪郭線抽出

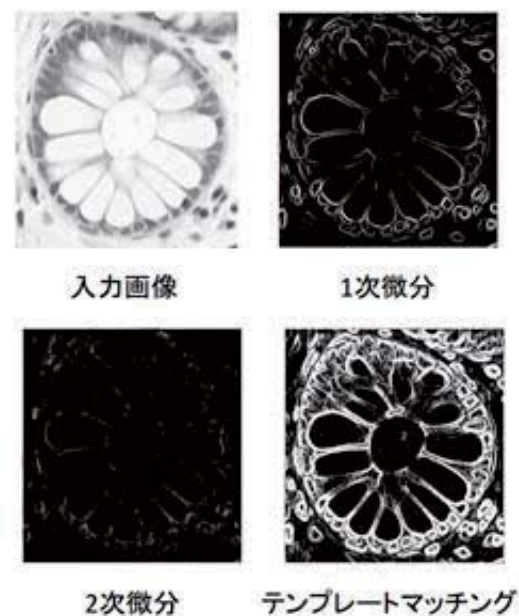


図 17 メディアンフィルタをかけた
正常細胞の輪郭線抽出

さらに図 16 と図 17 の 1 次微分およびテンプレートマッチングの画像に対して 2 値化と細線化処理を行い、結果を比較した。

図 18, 図 19 いずれの場合も平滑化フィルタよりもメディアンフィルタをかけたほうが、ノイズの影響を受けずに基底膜を抽出することができた。また、1 次微分よりもテンプレートマッチングを用いたほうがよりはっきりと基底膜を抽出できている。

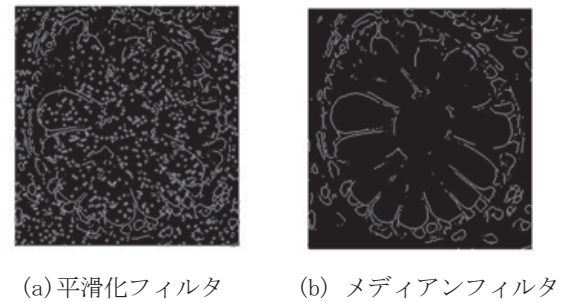


図 18 1 次微分の細線化

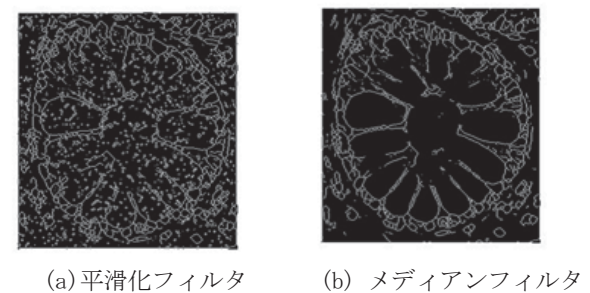


図 19 テンプレートマッチングの細線化

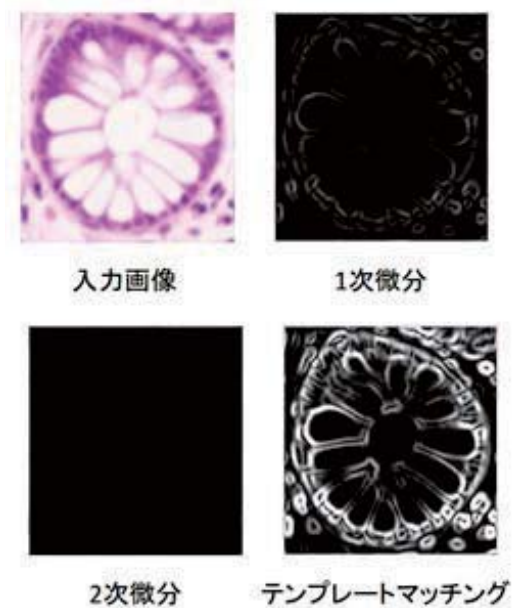


図 20 ぼやけた正常細胞の輪郭線抽出

7.1.2 輪郭がぼやけた画像の基底膜の抽出

画像がぼやけ、輪郭がはっきりとしない場合の基底膜の抽出を行う。ぼやけた画像に対して1次微分、2次微分、テンプレートマッチングを行った結果を図20に示す。

図11の正常細胞と比較すると、輪郭線がはっきりと抽出できていない。とくに輪郭の強さを表す2次微分が全体的に暗くなってしまっている。

次に、これまでと同様に2値化と細線化処理を行った。図21(a)の1次微分では、輪郭線をしっかりと抽出できなかったため、2値化をうまく行えず、細線化処理もできていない。図21(b)のテンプレートマッチングも細胞の形をうまく抽出することができていない。



(a) 1次微分 (b) テンプレートマッチング
図21 ぼやけた画像の細線化

図21(a)、図21(b)ともに輪郭線を抽出できたとは言えないため、鮮鋭化フィルタを用いて正常細胞の輪郭線の抽出を行った。ぼやけた画像に対して鮮鋭化フィルタを施した結果を図22に示す。

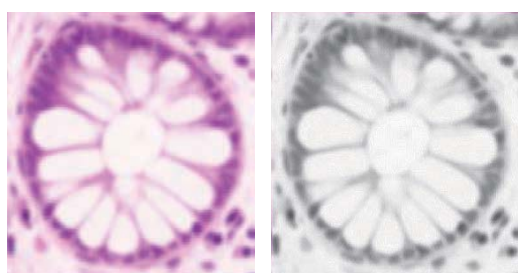


図22 鮮鋭化フィルタによるエッジの強調

これまでと同様、1次微分、2次微分およびテンプレートマッチングによって輪郭線の抽出を行い(図23)、その後、2値化および細線化を行った。鮮鋭化フィルタを用いて画像のエッジ

を強調した結果、ぼやけた画像と比較して輪郭は抽出できているが、画像がいびつになってしまっている。

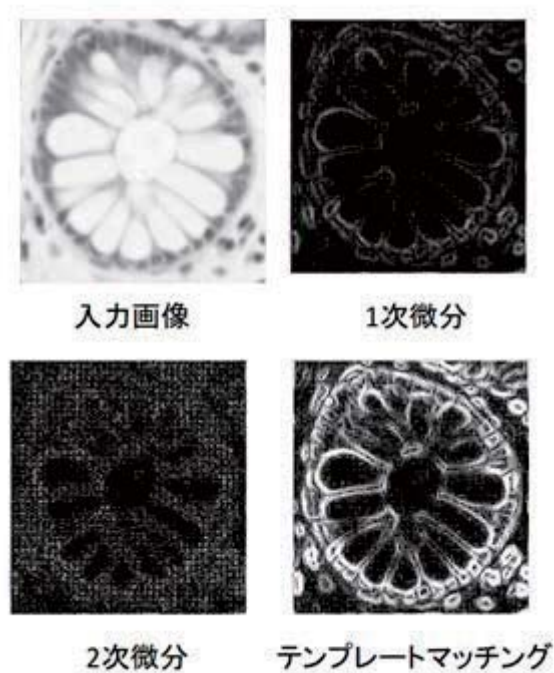
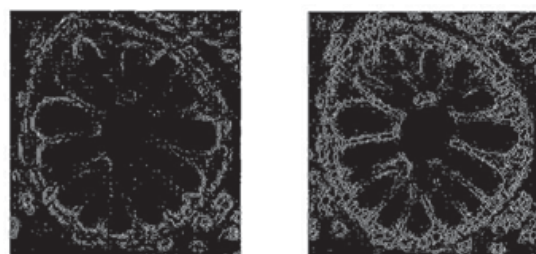


図23 鮮鋭化フィルタをかけた正常細胞の輪郭線抽出



(a) 1次微分 (b) テンプレートマッチング
図24 鮮鋭化フィルタをかけた画像の細線化

7.2 腺腫細胞

腺腫細胞画像に対して1次微分、2次微分、テンプレートマッチングによる輪郭線の抽出を行った結果を図25に示す。さらに1次微分とテンプレートマッチングに対して2値化を行い、細線化処理を施した画像を図26に示す。

図示のとおり、1次微分、テンプレートマッチングともに基底膜が崩れており、輪郭線を判断することができない。

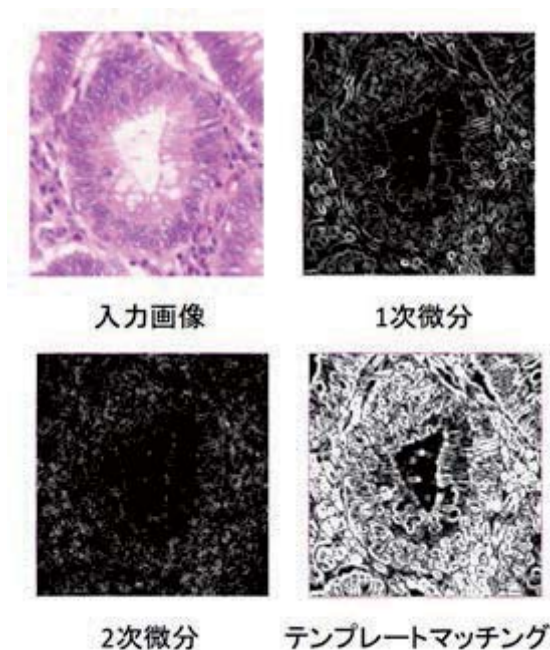
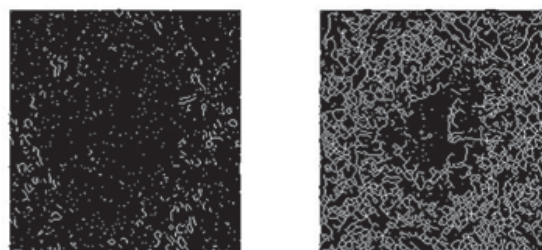


図 25 腺腫細胞の輪郭線抽出

7.2.1 ノイズのかかった腺腫細胞の基底膜の抽出

ノイズが付与された腺腫細胞の画像に対して 1 次微分, 2 次微分, テンプレートマッチングを行い, 2 値化した後, 細線化を行った。

スパイクノイズがのると, 正常な画像でも基底膜を抽出することができなかったが, 腺腫細胞の場合には, さらに判別が難しくなっている。



(a) 1 次微分 (b) テンプレートマッチング
図 28 細線化

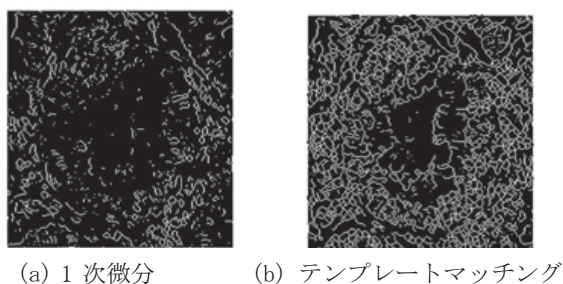
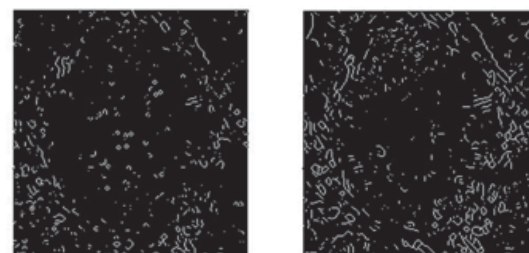


図 26 細線化



(a) 平滑化フィルタ (b) メディアンフィルタ
図 29 1 次微分の細線化

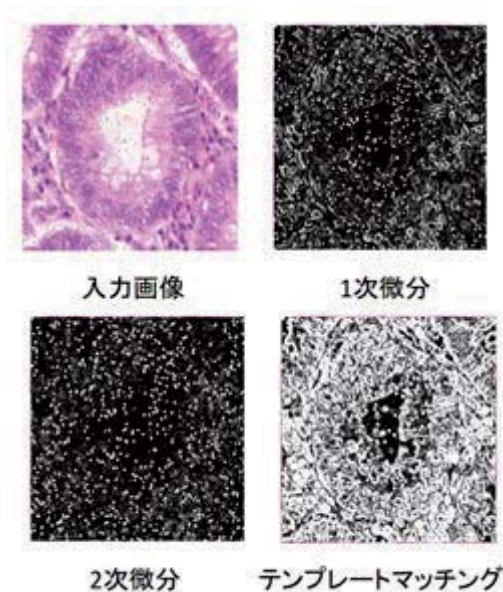


図 27 ノイズのかかった腺腫細胞の輪郭線抽出



(a) 平滑化フィルタ (b) メディアンフィルタ
図 30 テンプレートマッチングの細線化

これに対して平滑化フィルタやメディアンフィルタを適用した場合の効果を検証した。図 29 および図 30 が示すとおり, 平滑化フィルタ, メディアンフィルタともに形が崩れて基底膜を抽出することができない。しかし両者を比較すると, 正常細胞と同様, 平滑化フィルタよりもメディアンフィルタの方が形を抽出できているといえ

る。

7.2.2 輪郭がぼやけた画像の基底膜の抽出

正常細胞と同様, 腺腫細胞でも画像がぼやけ, 輪郭がはっきりしない場合の基底膜の抽出を行った。ぼやけた画像に対して1次微分, 2次微分, テンプレートマッチングを行った後, それぞれに対して2値化および細線化処理を行った。

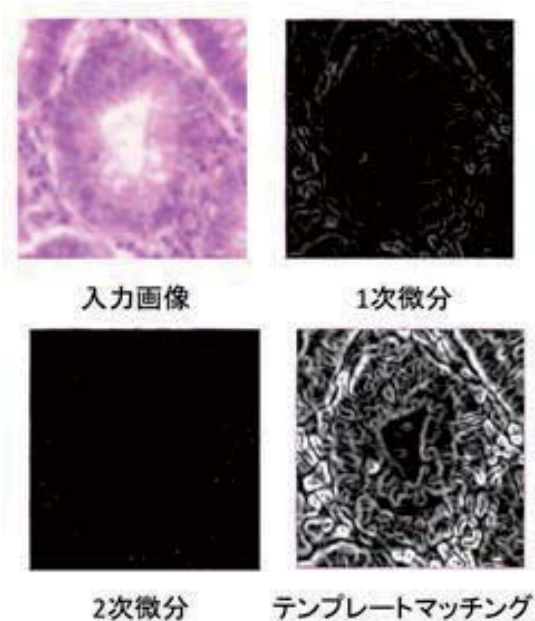
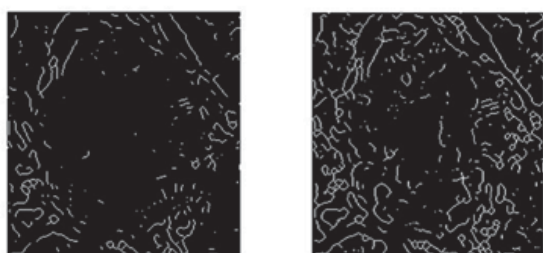


図 31 ぼやけた腺腫細胞の輪郭線抽出



(a) 1次微分 (b) テンプレートマッチング
図 32 ぼやけた画像の細線化

図 31 から輪郭線をきちんと抽出できなかったため, 2 値化と細線化処理をうまく行えなかったが, 図 26 の細線化処理と比べると, ノイズが少なくなっている。図 32 の 1 次微分とテンプレートマッチングとの比較では, これまでと同様, テンプレートマッチングのほうが比較的是っきりと輪

郭線を抽出できている。

正常細胞と同様に, ぼやけた画像に対して鮮鋭化フィルタを施した結果を図 33 に示す。

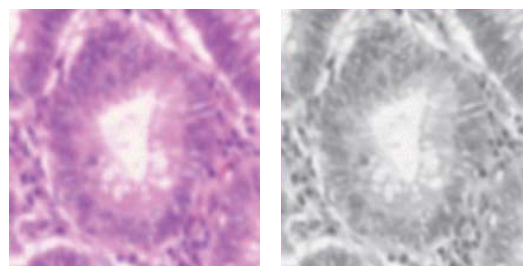


図 33 鮮鋭化フィルタによるエッジの強調

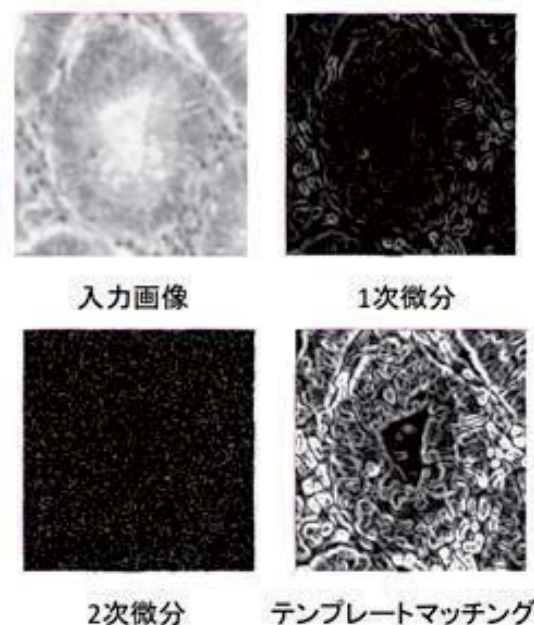


図 34 鮮鋭化フィルタをかけた腺腫細胞の輪郭線抽出



(a) 1次微分 (b) テンプレートマッチング
図 35 鮮鋭化フィルタをかけた画像の細線化

これまでと同様、輪郭線の抽出を行い、2 値化と細線化を行った。

図 35(a) と図 35(b) を比較すると、テンプレートマッチングを用いた処理ではおおよその輪郭を掴んでいるが、基底膜が崩れてしまっているため、基底膜を抽出することはできない。

8. おわりに

本研究では、基底膜外の画像除去の操作性と腺腔および核クラスターの抽出精度の向上を目的として、フィルタリング処理と輪郭線抽出に基づく基底膜の判定を試みた。なお、大腸癌は進行するにつれて細胞の形を留めなくなってしまうため、対象としたのは正常細胞と腺腫細胞の画像である。

得られた結果を整理すると以下のとおりである。

- (1) 1 次微分、2 次微分、テンプレートマッチングによる輪郭線の抽出を行った後、1 次微分とテンプレートマッチングによる画像に対して 2 値化と細線化処理を行った。正常細胞では、輪郭線を抽出でき、基底膜を目視することができた。
- (2) ノイズがかかった画像に対して平滑化フィルタやメディアンフィルタを適用した結果、平滑化フィルタよりもメディアンフィルタの方が高い効果が得られた。ノイズの除去によって核クラスターの抽出精度の向上を期待できる。
- (3) 輪郭がぼやけた画像に対して鮮鋭化フィルタを用いて画像のエッジを強調した結果、鮮鋭化フィルタを適用しない場合と比較すると、輪郭線は抽出できているが、画像が歪んでしまった。
- (4) 基底膜の輪郭線を閉じた状態で得ることができなかった。このため、基底膜外の画像を自動的に除去することはできないが、抽出された基底膜の輪郭線は、ペイントや Pixia などの画像処理ソフトを用いた手作業による画像除去の一助となり得る。

参考文献

- 1) 熊谷勝男, ガン転移メカニズムの解明と治療, 日経サイエンス, Vol. 23, No. 9, 20 (1993).
- 2) J. レニー, R. ラスティング, 特集 ガンを知る: ガン克服への道, 日経サイエンス, Vol. 26, No. 12, 12 (1996).
- 3) 岡崎明彦, 宮島佐介, 長嶺共全: “大腸癌の成長シミュレーションシステムの開発と大腸癌組織のフラクタル性”, 情報科学リサーチジャーナル Vol. 13, 3 (2006).
- 4) 岡崎明彦, 長嶺共全, 小野謙三, 宮島佐介: “大腸癌進行状況確認システムの開発”, 情報科学リサーチジャーナル Vol. 15, 31 (2008).
- 5) 石倉浩 監訳, 人体病理学 原書第 2 版, (南江堂, 2002).
- 6) 杉山賢二, 基礎と実践, 画像処理入門, (コロナ社, 2010)
- 7) 井上誠喜, 他 5 名, C 言語で学ぶ実践画像処理 (オーム社, 2005)



岡崎明彦
工学部 情報工学科教授
大腸癌の成長シミュレーションシステムと大腸癌進行状況確認システムの開発ならびに交通流シミュレーションシステムの開発に従事。



長嶺共全
びわこ学院大学短期大学部 教授
大腸癌の成長現象のシミュレーション化と大腸癌悪性度の判定基準の作成に関する研究に従事。



小野謙三
公立陶生病院 病理部
診断病理学に関する研究に従事。