

デジタル正立顕微鏡を用いた複数免疫染色標本の位置合わせ機能の開発[†]

森山真樹, 佐藤慎哉, 渡邊博忠, 山浦遼平, 森屋健太郎,
古田伸一, 菊田 聡, 平尾大介, 中田千枝子

Position Alignment Function Development of Multiple Immunostained Specimens using a Digital Imaging Microscope

Masaki MORIYAMA, Shinya SATO, Hirota WATANABE, Ryohei YAMAURA, Kentaro MORIYA, Shinichi FURUTA, Satoshi KANDA, Daisuke HIRAO and Chieko NAKADA

病理診断では病変部位から細胞や組織のサンプルを採取し、薄くスライスして染色を施すことで病理標本を得て、病理医が顕微鏡を用いて細胞や組織の形態を観察することで、病気の原因や進行状況を明らかにする。特定のたんぱく質やその他の物質を抗体を用いて特異的に染色する免疫染色では、組織のサンプルを連続に薄くスライスすることで近接した位置の連続標本を得て、各標本1枚ずつに1種類の染色を施し、総計3~20枚程度の免疫染色標本を観察して診断に供する。さらに各標本で同じ位置を顕微鏡で観察しながら探索して結果を記憶する必要があり、病理医の負担となっている。

デジタル正立顕微鏡では標本全体のデジタル画像を取得可能である。標本全体の画像を用いて標本間の位置ずれを自動検出し、同じ位置を自動探索する位置合わせ機能を開発した。さらに各標本の同一位置における拡大画像をモニターに並べて表示する機能を開発することで、顕微鏡観察時の探索や記憶といった病理医の負担軽減を目指した。

本稿では、複数免疫染色標本の位置合わせ機能に関して、デジタル正立顕微鏡の特徴及びデジタル画像を用いた位置合わせ方法について解説する。

In pathological diagnosis, pathologists routinely examine stained cell or tissue samples, extracted from lesion sites, to identify disease causes and assess progression. This process often involves immunohistochemical staining, where antibodies are used for selectively staining specific proteins or other substances within the samples. However, this approach can be demanding for pathologists as locations must be consistently observed and the results from identical locations should be memorized across multiple specimens.

To mitigate this challenge, we leveraged digital imaging microscope capable of capturing digital images of the entire specimen in a single shot. We developed a function that uses these images to detect any positional shift between the specimens automatically and, subsequently, automatically search for identical locations for alignment. Furthermore, we aimed at alleviating the burden on pathologists during microscopic observation by developing a feature that displays microscopic images of higher magnification from identical positions across different specimens side by side on a monitor.

In this study, we present digital imaging microscopic features and the alignment approach using digital images related to the alignment function for multiple immunostained specimens.

Key words 顕微鏡, 位置合わせ, 自動化, 病理切片, デジタルパソロジー
microscope, alignment, automation, pathological specimen, digital pathology

1 はじめに

病理診断では、病変部位から細胞や組織のサンプルを採取し、それを薄くスライスして染色することで病理標本作製する。その後、病理医が顕微鏡を用いて細胞や組織の形態を観察し、病気の原因や進行状況を明らかにする。抗

体を用いて特定のタンパク質やその他の物質を特異的に染色する免疫染色技術の発展により、各種の病態をより詳細に理解し、病状をより精密に診断することが可能となった[1]。免疫染色では、3~20種類の異なるタンパク質等を染色するため、同数の病理標本を準備する必要がある。そのため、組織のサンプルを連続してスライスし、組織上の同

[†] 本稿は特定の医療機器の広告を意図していません。

一座標の連続標本を得て、各標本に異なる免疫染色を施して観察する。しかしながら、記憶に頼り各標本で組織上の同じ位置を顕微鏡で観察しながら結果を記録する作業は、病理医の負担となっている。

ニコンは顕微鏡でありながら接眼レンズをなくし、ディスプレイで観察画面を確認可能であるデジタル正立顕微鏡を開発した。このデジタル正立顕微鏡では、標本全体のデジタル画像を取得することが可能であり、取得した画像を用いて標本間での同じ位置を自動で探索する位置合わせ機能を開発した。さらに、各標本の同じ位置における顕微鏡拡大画像をモニターに並べて表示する機能も開発し、病理医の負担軽減を目指した。

本稿では、このデジタル正立顕微鏡による複数の免疫染色標本の位置合わせ機能について、デジタル画像を用いた位置合わせの手法に焦点を当てて説明する。

2 免疫染色標本の利用と課題

特定のタンパク質やその他の物質を特異的に染色する免疫染色は、医学研究および診断・治療の発展に寄与してきた。免疫染色の基本的な原理は、抗体と抗原の特異的な結合を利用することである。抗体は特定の抗原に対して高い親和性を持つため、特異的に抗原を標的とすることが可能である。特定のタンパク質の存在と位置を明確に把握することが可能なため、多くの分野で広く使用されている。特に、疾患の診断や治療の効果予測、新しい薬物の開発などの医学的応用において、免疫染色は不可欠な技術となっている。

医学研究や病理診断において、免疫染色により特定可能なタンパク質の種類が増えることで、新規メカニズムの解明や診断精度が向上する可能性がある。以下に、病理診断および医学研究において行われる標本の作成から評価までのプロセスの概略および課題（下線部 A-D）について述べる。

■ 標本準備 (Fig. 1)

- ① 標的とする臓器から摘出したサンプルへ固定等の処理を行い、パラフィンに包埋してブロックを作製する。
- ② 厚さ約 4 μm で薄切した切片をスライドガラス上に貼り付ける（ブロックから連続して薄切、3-20枚を作製）。
- ③ スライドガラス上の切片を染色する（HE 染色、Ki67、CD3等の免疫染色）。

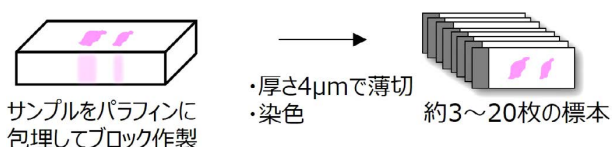


Fig. 1 標本の準備

- ④ カバーガラスと封入剤を用いて切片を保護する。

■ 標本観察と評価 (Fig. 2)

以下のプロセスは通常、正立顕微鏡を用いて行われる。

- ① HE 染色標本を観察して注目地点を 3-5 箇所決定する。このとき観察者は注目地点の位置と見え方を記憶する (A)。
- ② 1 つ目の免疫染色標本を観察して、HE 染色で記憶した位置や見え方から同じ位置を探して観察する (B)、所見 (標的たんぱく質の有無など) を記憶する (C)。
- ③ 2 つ目の免疫染色標本を観察して、HE 染色で記憶した位置や見え方から同じ位置を探して観察する (B)、所見 (標的たんぱく質の有無など) を記憶する (C)。
- ④ 上記の免疫染色標本の観察を最大で約20標本で実施し、結果を解析する。すべての所見を一度に記憶することは困難であるため、例えば数標本ごとにレポートに記録を取る。再度確認したい場合などは、標本を再観察する (D)。

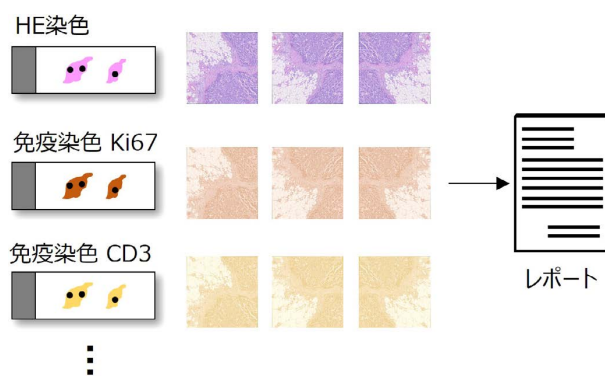


Fig. 2 HE 染色及び免疫染色の標本観察と評価

このような記憶力に偏重した標本観察・評価法を病理診断では日常的に繰り返し実施するため、病理医の大きな負担となっている。

3 デジタル正立顕微鏡を用いた位置合わせ機能

デジタル正立顕微鏡は標本をセットしてロードボタンを押すと、標本ロード時に標本全体を俯瞰できるマクロ画像を撮影する。標本は観察位置にロードされると対物レンズを通した観察画像（マイクロ画像）がライブでディスプレイに表示され、マクロ画像も同時に表示される (Fig. 3)。マクロ画像の観察位置はシステムが記憶可能であり、観察位置におけるマイクロ画像は保存可能である。

デジタル正立顕微鏡の標本ロード時に取得されるマクロ画像を用いて、複数の標本のずれを検知して補正することで、同じ位置を探索して表示する方法を考案し、Fig. 4 のシステムワークフローを実現した。以下、各ステップを説明する。



Fig. 3 デジタル正立顕微鏡のディスプレイ表示
(中心画像がマイクロ画像 (上), マクロ画像 (下))

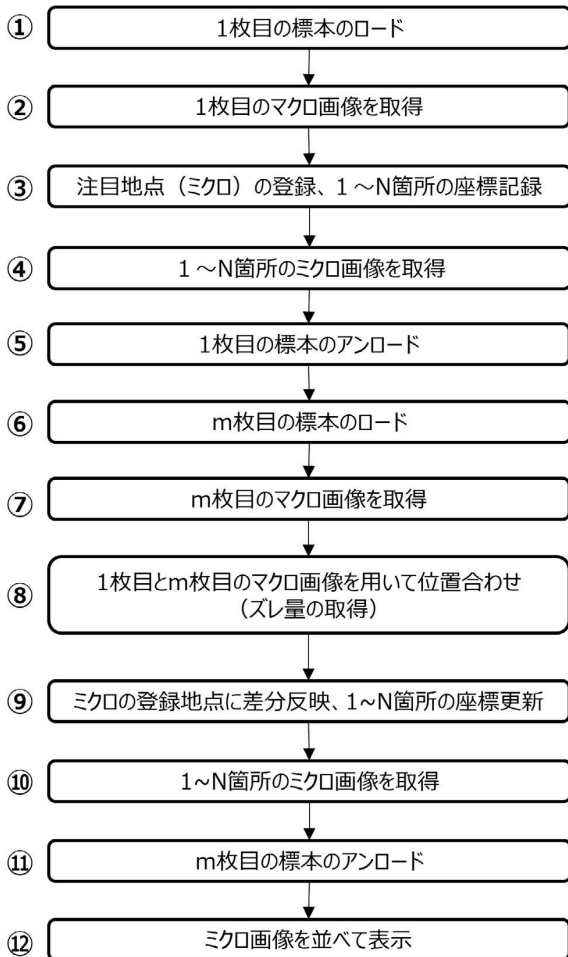


Fig. 4 位置合わせ機能のワークフロー概要

①～②：1枚目の標本のマクロ画像取得

観察者は1枚目の標本をセットしてロードする。システムは1枚目の標本のマクロ画像を取得する (Fig. 5)。1枚目は組織形態を把握するために HE 染色が選択されることが多い。

③～④：1枚目の標本の注目地点の登録

観察者はマイクロ画像を目視して、1枚目の標本における注目地点をシステムに登録する。システムは登録された地点におけるマイクロ画像を撮像して記憶する (Fig. 5)。注目地点は複数登録され、3-5箇所ほど登録されることが多い (最大12箇所登録可能)。

⑤：1枚目の標本のアップロード

観察者は1枚目の標本をアップロードする。

⑥～⑦：m枚目の標本のマクロ画像取得

観察者はm枚目の標本をセットしてロードする。システムはm枚目の標本のマクロ画像を取得する (Fig. 5)。2枚目以降は免疫染色の標本が選択されることが多い。病理診断においては最大で約20枚の免疫染色の標本が準備される。

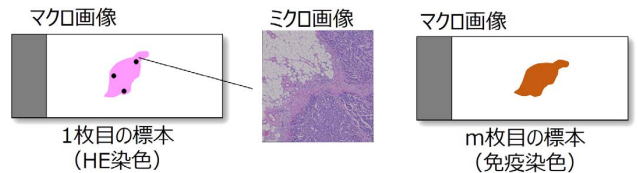


Fig. 5 マクロ画像とマイクロ画像

⑧：マクロ画像を用いた位置合わせ

システムは1枚目とm枚目の標本のマクロ画像を用いて位置合わせを実施する (Fig. 6)。位置合わせのアルゴリズムは Scale-Invariant Feature Transform (SIFT) [2] を用いており、マクロ画像間の位置ずれ・角度ずれ量 ($\Delta XY, \Delta\theta$) を算出する。SIFTの詳細については後述する。

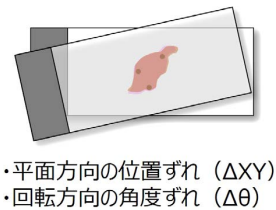
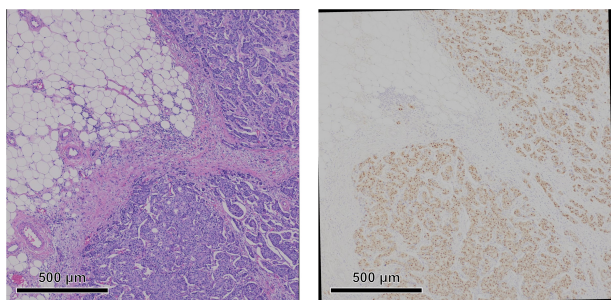


Fig. 6 SIFT を用いたマクロ画像のずれ量検出

⑨～⑩：m枚目の標本のマイクロ画像取得

システムはステップ⑧で得られた位置ずれ量 ΔXY をステップ③の1枚目の標本の注目地点の座標に反映することで、m枚目の標本における同一注目地点の座標を得て更新する。システムは新規座標におけるマイクロ画像を取得し、角度ずれ量 $\Delta\theta$ を反映した回転画像を記憶する。2～m枚目の標本に対して⑥～⑩の工程を繰り返し、各標本における同一注目地点のマイクロ画像を取得する。

Fig. 7 に示すように1枚目とm枚目のマイクロ画像は同じ位置であるので形態が近く、m枚目のマイクロ画像は回転のずれ量に応じて回転した画像が記録される。



1枚目の標本 (HE染色) m枚目の標本 (免疫染色)

Fig. 7 1枚目とm枚目のマイクロ画像

⑪ : m枚目の標本のアンロード
 観察者はm枚目の標本をアンロードする。

⑫ : ミクロ画像を並べて表示

観察者は記録されたマイクロ画像から最大10枚のマイクロ画像を選択して、並べて表示を選択する。システムは選択された各標本における同一注目地点のマイクロ画像をディスプレイ上に並べて表示する (Fig. 8)。

並べて表示された画像は、観察者がいずれかの画像を拡大縮小またはXY方向に移動させると、すべての画像が連動して動作する (Fig. 8)。観察者は画像を拡大しながら各地点の詳細を比較可能となる。



Fig. 8 ミクロ画像を並べて表示
 (上: 標準, 下: デジタルズーム)

以上のデジタル正立顕微鏡の位置合わせ機能のワークフローにより、Table 1 に示すようにHE染色及び複数免疫染色標本の課題に対する解決策が得られ、特に病理診断における病理医の負担軽減が期待できる。

Table 1 HE染色及び複数免疫染色標本の課題と解決策

課題・解決策	内容
課題 A	観察者は位置と見え方を記憶する
解決策 A	システムが位置と見え方を記憶する
課題 B	観察者は同じ位置を探す
解決策 B	システムが同じ位置を探索する
課題 C	観察者は観察像から所見を記憶する
解決策 C	システムが画像を記憶する
課題 D	観察者は標本を再観察する
解決策 D	システムが一度に画像を並べて表示する

4 位置合わせ機能のアルゴリズムと精度評価

デジタル正立顕微鏡における位置合わせのアルゴリズムとしてSIFTを採用した。SIFTは、David G. Loweによって1999年に発表された画像認識における特徴検出手法である [2]。スケール変化、回転、視点変化、照明変化に対する強力な不変性を持つ特徴を検出する能力があるため、画像の位置合わせや物体認識など広く利用されている。以下では、標本画像における位置合わせ機能のアルゴリズムについて説明する。

はじめにマクロ画像の特徴点を抽出する。Fig. 9 に示すように、マクロ画像を平滑化し、スケール (ぼかしの強度) を変更した画像間の差分である Difference of Gaussian (DoG) 画像を作成する。注目画素に対して、スケール方向も含めた26近傍の画素値を比較し、DoG値が極値を取る画素を探索する。DoG値が極値を取る画素は、コントラストの変化量が多いことを示すため、情報量が多いと判断できる。このようにして情報量が多い画素を特徴点の候補として抽出し、上位の特徴点を位置合わせに利用する。

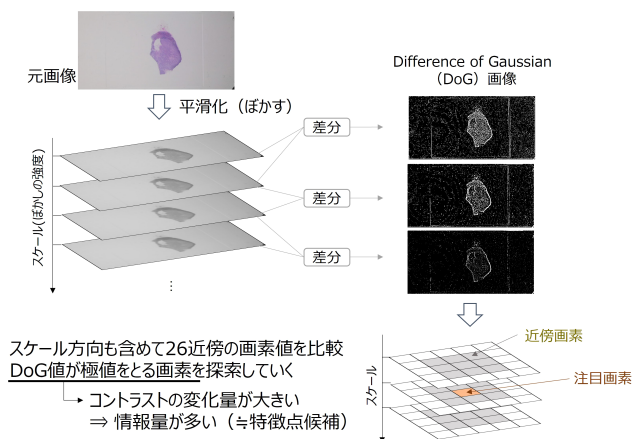


Fig. 9 SIFTを用いた標本画像の特徴点の抽出

次に、特徴点の特徴量を計算する。Fig. 10 に示すように、特徴点の周辺を4×4のブロックに分割し、各ブロッ

クごとに8方向の輝度の勾配強度を算出する。ブロック数と勾配強度より、128次元の勾配強度の情報として特徴量化する。

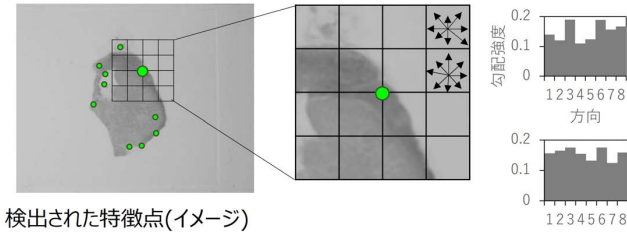


Fig. 10 SIFT を用いた標本画像の特徴量の算出

最後に、特徴点を対応付け、2つの画像間の位置ずれ・角度ずれ量 ($\Delta XY, \Delta\theta$) を算出する。Fig. 11 に示すように、HE 染色の1つの特徴量と、免疫染色のすべての特徴量のユークリッド距離を計算する。ユークリッド距離が最も小さい特徴点を対応する特徴点として決定する。ユークリッド距離が最も小さいとは、上記の128次元の勾配強度を比較した際にその差が最も小さいことを示す。

対応する特徴点が最低2つ存在する場合、これらの特徴点が一一致するように画像を重ね合わせることで、2つの画像間の位置ずれ・角度ずれ量 ($\Delta XY, \Delta\theta$) を得ることができる。

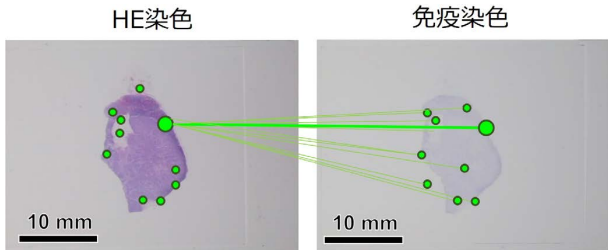


Fig. 11 SIFT を用いた標本画像の特徴点の対応付けイメージ

デジタル正立顕微鏡における位置合わせ機能のアルゴリズムでは、上述の各工程におけるパラメーターを多数の標本を用いて最適化した。以下では、この位置合わせ機能の精度を評価した結果について説明する。

精度評価には、デジタル正立顕微鏡の10倍対物レンズの画像を使用した。位置合わせ後に取得された2つの標本のマイクロ画像について、画像の微細構造が完全に重なるように目視で手動での重ね合わせを行った。Fig. 12 に示すように、重なった面積（青色斜線）をマイクロ画像の全面積（緑枠）で割った値を精度指標とした。この指標は0から1の範囲をとり、1に近いほど位置合わせの精度が高いことを示す。

44標本から22対の標本セットを準備し、位置合わせ機能

によって得られたマイクロ画像の位置合わせ精度を評価したところ、Fig. 12 の箱ひげ図に示すように、位置合わせ精度は約0.95と高い精度を示した。一方、標本は形状や色味などが非常にバラエティーに富んでおり、これらの標本にも対応できるように、引き続き精度とロバスト性の向上を検討する。

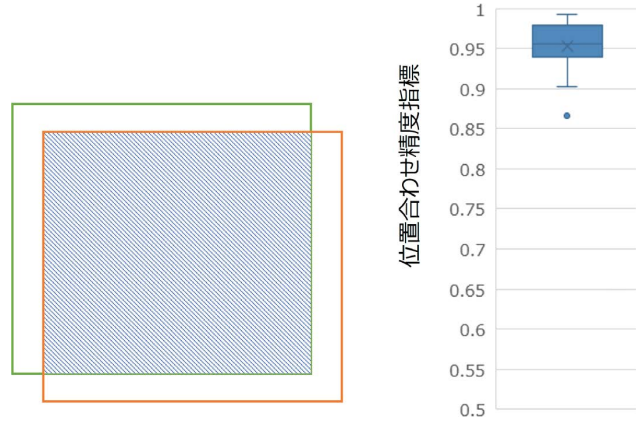


Fig. 12 位置合わせ精度の評価指標（左）と結果（右）

5 まとめ

デジタル正立顕微鏡は、標本全体のマクロ画像と注目地点の拡大マイクロ画像を取得することが可能である。本稿では、マクロ画像を用いた位置合わせ機能により、複数の免疫染色標本における注目地点の探索とマイクロ画像の表示を実現できる可能性を示し、位置合わせのアルゴリズムについて詳細に説明した。位置合わせ機能による観察支援が観察者の負担を軽減できると期待している。今後、位置合わせ機能の精度とロバスト性をさらに向上させることで、現在求められている、より微小な病変に対する複数の免疫染色標本の観察・評価の精度を高め、医学研究や病理診断の発展に寄与することを目指す。

引用文献

- [1] M. L. Compton, M. Hogan, and E. S. Reisenbichler, "Differences in immunohistochemistry utilization by general and breast subspecialty pathologists at a large academic institution," *Annals of Diagnostic Pathology*, vol. 42, pp. 92-95, 2019.
- [2] D. G. Lowe, "Object recognition from local scale-invariant features," *Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision*, vol. 2, pp. 1150-1157, 1999.

森山真樹 Masaki MORIYAMA
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

佐藤慎哉 Shinya SATO
地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター
Kanagawa Cancer Center Research Institute

渡邊博忠 Hirotada WATANABE
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

山浦遼平 Ryohei YAMAURA
株式会社ニコンシステム
Nikon Systems Inc.

森屋健太郎 Kentaro MORIYA
株式会社ニコンシステム
Nikon Systems Inc.

古田伸一 Shinichi FURUTA
ヘルスケア事業部 技術統括部 設計部
Designing Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

荻田 聡 Satoshi KANDA
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

平尾大介 Daisuke HIRAO
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit

中田千枝子 Chieko NAKADA
ヘルスケア事業部 技術統括部 システム開発部
System Development Department
Technology Solutions Sector
Healthcare Business Unit