

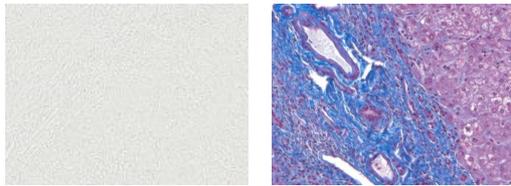
明視野顕微鏡による観察画像を用いた無染色標本からの疑似 Masson's trichrome 染色

Digital Masson's trichrome staining of unstained pathological tissue using observation images by brightfield microscopy

吉岡 佳音[†] 篠田 一馬[†]
Kano Yoshioka Kazuma Shinoda

1. はじめに

病理診断とは、患者から採取された細胞や組織を顕微鏡で観察して病変を診断することを指す。このとき組織の構成要素は光に対してどれも同じような透過性があるため、採取したままの無染色状態 (図 1(a)) では病変の識別が困難となる。このため染色液を用いた組織染色という作業が行われている。組織染色法の 1 つにマッソントリクローム (Masson's trichrome; MT) 染色 (図 1(b)) があり、これは膠原線維の染め分けを目的とする染色方法で、鉄ヘマトキシリンにより細胞核を黒褐色、マッソンにより細胞質を赤、アニリン青により膠原線維を青に染め分ける [1]。



(a) 無染色 (b) MT 染色
図 1 MT 染色例 (ヒト肝病理標本)

しかし、組織染色には様々な課題がある。その 1 つに、染色性が様に定まらないことが挙げられる。この理由として、染色手技や染色工程の違い、染色液の劣化などがある [2]。また、染色に長い時間を要するという課題もある。MT 染色標本作成の場合、終了までに約 2 時間半必要になり、迅速さに欠ける。そのため、染色結果の均質化および染色作業の標準化を目的として組織染色をコンピュータ上で仮想的に行う研究がなされている [3]。これを疑似染色 (digital staining) と呼ぶ。本分野では深層学習を用いた方法が主流になっており [4-10]、深層学習を用いた疑似染色プロセスは図 2 のようになっている。患者から採取した組織から作成した病理標本を顕微鏡によるイメージングで画像化し、得られた画像をニューラルネットワークに入力として与え、疑似染色画像を取得する。

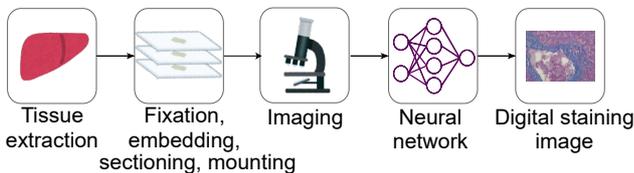


図 2 疑似染色プロセス

無染色標本からの疑似染色を実現している研究 [4-8] では、蛍光観察や定量的位相イメージング (quantitative phase imaging; QPI) を用いて無染色標本のイメージングを行い、特徴を抽出している。しかし、蛍光顕微鏡やホログラフィック顕微鏡は病理診断の現場における普及率が低く、汎用

[†] 宇都宮大学大学院地域創生科学研究科
Graduate School of Regional Development and Creativity,
Utsunomiya University

性に欠ける。また、[9, 10] では明視野顕微鏡を使用した疑似染色を実現しているが、無染色標本からの疑似染色ではないため、イメージング前に染色作業が必要になる。そこで本研究では、広く用いられている明視野顕微鏡によるイメージングを行い、無染色標本からの疑似 MT 染色を行う。本手法では、明視野顕微鏡による 3 種類の観察によって無染色標本を撮影し、深層学習を用いた疑似染色を行う。第 2 章では関連研究、第 3 章では提案手法、第 4 章では実験および疑似染色結果、第 5 章ではまとめと今後の課題を述べる。

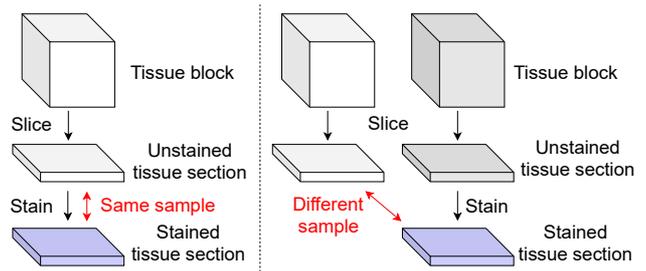
2. 関連研究

2.1 疑似染色における光学系

無染色標本からの疑似染色では、イメージング法に特殊な観察法および顕微鏡を用いて画像化を行っているケースが多い [4-8]。[4-7] では蛍光顕微鏡を用いて、[8] では QPI を用いて病理標本の画像化が行われた。蛍光観察とは、標識となる蛍光色素や蛍光たんぱく質を用いて、観察したい部分を強調する観察法である。また、QPI とは光がサンプルを通過するときの波面 (位相シフト) 変化から定量的位相情報を取得し、ピクセル値として保存するイメージング法である。QPI の主要なアプローチとして干渉法、ホログラフィ、波面センシング、位相回復アルゴリズムがあり、特にホログラフィック顕微鏡は病理診断においては普及率が低く、汎用性に欠けるため、疑似染色分野において利用することは困難であると考えられる。

2.2 深層学習を用いた疑似染色

本分野では深層学習を用いた方法が主流になっている [4-10]。学習における教師データを確保する方法を図 3 に示す。



(a) ペア画像の取得 (b) 非ペア画像の取得

図 3 教師画像の取得法

ペアになった教師データを確保する場合 (図 3(a)) は、薄切片の疑似染色前の標本を大量に撮影した後、目的の染色状態に染色し、同一標本を再撮影することで取得する。このとき再撮影には、ホールスライドスキャナーを使用しない限り、光学倍率が 10 倍または 20 倍の領域内で同一領域を探索する作業が必要になり、労力と時間がかかる [10]。この解決策には、異なるサンプル (非ペア) を用意して、無染色標本と組織染色標本それぞれの任意の領域を撮影する

方法がある (図 3(b))。[10] では、ホールスライドスキャナーなしで非ペア画像を確保しており、学習時にペア画像が不要なモデル Cycle-Generative Adversarial Networks (CycleGAN) による疑似染色を可能にしている。

3. 明視野顕微鏡による非ペア観察画像による無染色標本からの MT 疑似染色

関連研究の問題点として、汎用性の低い顕微鏡を用いたイメージングを行っていることとペア画像を用いた学習を行っていることを挙げた。この問題点を解決するために本研究では最も一般的な顕微鏡である明視野顕微鏡を用いた 3 種類の観察法により標本の画像化を行い、得られた画像を用いて、ペア画像が不要な学習モデルの CycleGAN による学習を行い、疑似 MT 染色画像を得る。本章では明視野顕微鏡によるイメージング法と CycleGAN による学習法の 2 つに分けて述べる。

3.1 明視野顕微鏡によるイメージング

本研究におけるイメージングでは、明視野顕微鏡を用いた 3 種類の観察を行う。それぞれの使用目的を表 1 に示す。

表 1 本研究のイメージング法

観察法	使用目的
明視野観察	組織の全体像の観察
偏光観察	複屈折性物質の明瞭化
微分干渉観察	組織構造のコントラストの強化

3.1.1 明視野観察法による撮影

明視野観察 (bright-field observation; BF) とは、サンプルを均一な光で照らし、透過した光を観察する最も一般的な方法である (図 4(a))。光源からの光がコンデンサレンズを通りサンプルへ集光される。光がサンプルを透過し、その光が対物レンズを通ることで光束を集光して像面に実像を作る (図 5 の BF microscopy)。本研究では、組織の全体像を観察するために明視野観察を行う。また、より正確な明視野 RGB 画像を取得するために分光フィルタを使用し、多波長撮影を行う。

3.1.2 偏光観察法による撮影

偏光観察 (polarized light observation; PL) とは、サンプル内の微弱な偏光性を明暗のコントラストに変える観察法である。この観察法は明視野顕微鏡のコンデンサ側に偏光板 (偏光子、対物レンズ側にアナライザ (検光子) の 2 枚の偏光板を取り付けることで観察が可能になる (図 5 の BF microscopy に analyzer と polarizer を挿入)。このとき、アナライザと偏光板の透過軸を直交に配置するクロスニコル状態で観察を行うのが一般的である。クロスニコルに配置することで偏光板を通った直線偏光は、複屈折性を持つ物質を透過した場合、光の振動方向が変化するためアナライザを透過する光が現れる。一方で複屈折性を持たない物質を通った場合は光の振動方向が変化しないためアナライザは何も通さない。この違いによって、複屈折性物質が光ったような像を得ることができる。肝組織に含まれる膠原線維は複屈折性を持つ [11] ため、本研究では偏光観察により、膠原線維を明瞭化することを目的とする (図 4(b))。

3.1.3 微分干渉観察法による撮影

微分干渉観察 (differential interference contrast observation; DIC) とは、サンプル内の光路長の勾配から像を作り出す方法である (図 4(c))。この観察法は、明視野顕微鏡に 2 枚の偏光板と 2 つの微分干渉プリズムを取り付けることで観察

することができる (図 5 の BF microscopy に DIC prism、analyzer および polarizer を挿入)。微分干渉プリズムとは、結晶方向の直交する 2 つの楔型方解石を貼り合わせた光学素子である。偏光板からの直線偏光を下側微分干渉プリズムによって $\pm 45^\circ$ の偏光成分に分ける。そして、サンプルを透過した平行する 2 本の光が上側微分干渉プリズムによって再び 1 本の光に合成され、 90° の偏光成分のみがアナライザを透過する。表 2 のように屈折率の差が微小な組織構成要素間でもコントラストをつけて観察することが可能になる。このため、本研究では組織構造のコントラストの強化を目的として微分干渉観察を行う。

表 2 組織構成要素の屈折率比較

組織構成要素	屈折率
水 (細胞質の主成分)	約 1.33
細胞質	約 1.37-1.40
細胞核	約 1.38-1.41
膠原線維	約 1.55

明視野顕微鏡による 3 種類の観察法によって得られた画像に対して位置合わせを行い、ネットワークに入力するデータセットを作成する。

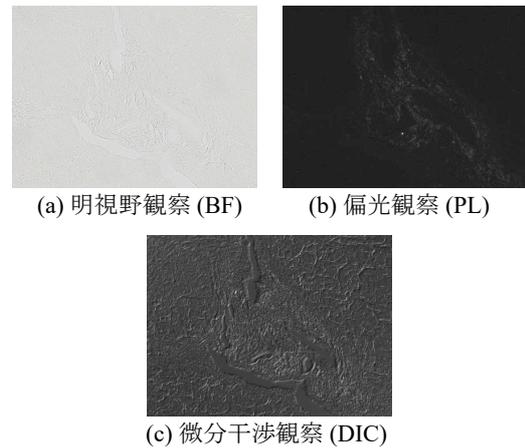


図 4 無染色肝標本の観察像

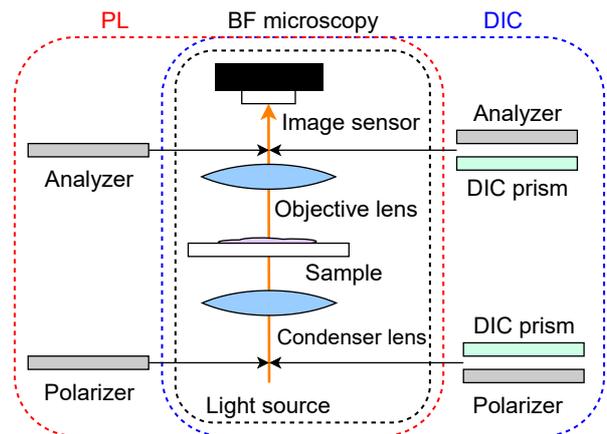


図 5 明視野顕微鏡を用いたイメージング法

3.2 CycleGAN を用いた疑似染色学習モデル

生成モデルの 1 種である敵対的生成ネットワーク (Generative Adversarial Networks; GAN)[12] は、データを生成する生成器 (Generator) と与えられたデータが本物が偽物かを判別する識別器 (Discriminator) の 2 つのニューラルネ

ネットワークから構成される学習モデルである。このとき生成器は識別器を欺くように学習し、識別器は生成データを正しく判別するように敵対的に学習を進める。

GAN の 1 種に CycleGAN [13] がある。これは、ペア画像を用意せずとも 2 つのドメインの画像を集めることで画像変換を可能にする手法である。CycleGAN を本研究の疑似染色に適用した場合の概念図を図 6 に示す。まず、無染色ドメイン (ドメイン UN) から MT 染色ドメイン (ドメイン MT) へと変換を行う Generator (UN to MT) で $x \in UN$ をドメイン MT に類似した画像 x' へと変換する。そして Discriminator (for MT) は x' とドメイン MT の画像 $y \in MT$ を比較し、Generator および Discriminator の最適化を行う。ここで、ペア画像を使用していない場合でも、変換前後の空間構造の保存をするために、CycleGAN ではもう 1 組の Generator および Discriminator を導入する。すなわち、ドメイン MT からドメイン UN への変換を行う Generator である Generator (MT to UN) と変換結果をドメイン UN と比較するための Discriminator (for UN) を定義する。ここで、Generator (MT to UN) に x' を入力して再びドメイン UN へと変換することで x'' を得る。このとき、 x と x'' は一致するはずである。そのため、 x と x'' の誤差を取り、その 2 つの誤差を小さくするように Generator を最適化することで空間構造の保存を可能にしている。

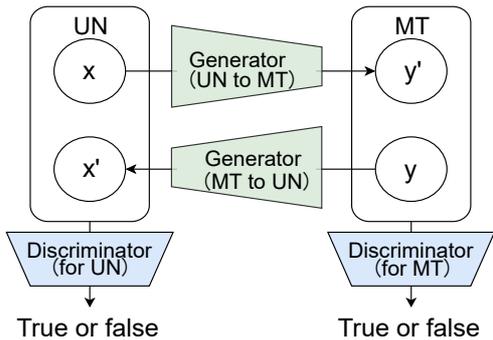


図 6 CycleGAN を本研究に適用した場合の概念図

本研究における Generator および Discriminator のネットワーク構造を図 7 および図 8 に示す。明視野 RGB 画像、偏光観察画像、微分干渉観察画像を Generator に入力し、疑似 MT 染色 RGB 画像へと変換する。3 種類の画像を Generator の入力することで、無染色標本の組織構造の特徴をネットワークで抽出しやすくなるという利点が生まれる。生成した疑似 MT 染色 RGB 画像と本物の MT 染色画像の損失を取ることで、その損失を小さくするように Generator の学習を進める。これを MT 染色から疑似無染色を生成する場合も同じように行い、学習を進める。Generator ネットワークには ResNet [14] が組みこまれており、層を深くすることによる勾配消失問題を、活性化関数を含む層を経由せずに入力と出力をつなぐ経路を作ることで解消している。Discriminator の入力 は Generator が生成した疑似 MT 染色 RGB 画像または本物の MT 染色 RGB 画像であり、最終的に入力画像が本物か偽物かを示す特徴マップを出力する。このとき、本物に近い場合は 1 を出力、偽物に近い場合は 0 を出力し、Generator と Discriminator の最適化を行う。このようにして、非ペアの教師データによる無染色からの MT 疑似染色を実現する。

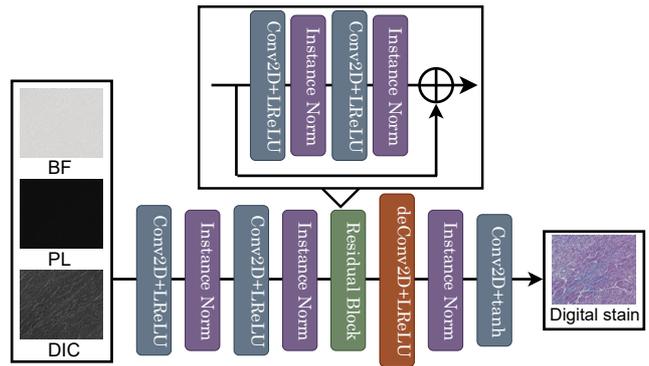


図 7 Generator のネットワーク構造

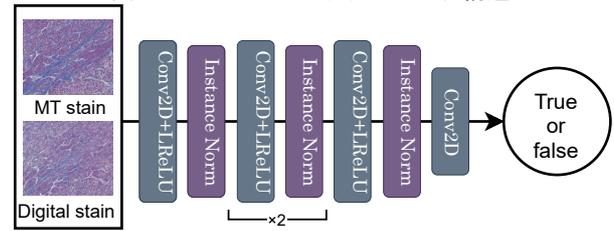


図 8 Discriminator のネットワーク構造

4. 実験と疑似染色結果

本実験では明視野顕微鏡に OLYMPUS 社の BX53F2、カメラに FLIR 社のモノクロカメラ GS3-U3-28S5、分光フィルタに CRi 社の VariSpec を使用した。また、肝病理標本は BioChain 社の Human Adjacent Normal (図 9) と Primary Tumor の 2 種類 (図 10) を使用し、そのうち無染色、MT 染色標本それぞれにおいて 10 箇所ずつ撮影を行った。光学倍率は 10 倍とした。明視野分光画像は 450-710 nm の波長間で 20 nm おきに 13 バンド撮影を行い、得られた分光画像から分光透過率を求めた上で、D65 照明の環境下における RGB 画像を算出した。また、偏光観察による撮影時は 2 枚の偏光板の透過軸が常に直交するように、それぞれを 0-170° で 10° ずつ動かし撮影を行った。撮影した複数枚の偏光観察画像は位相限定相関法により位置ずれを補正した後、画素ごとに画像間の最大値を抽出し、1 枚の合成偏光観察画像を得る。ネットワーク学習条件は表 3 に示す。

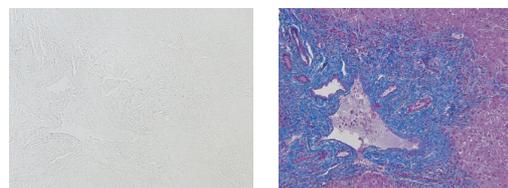


図 9 Normal (非がん患者) の肝病理標本

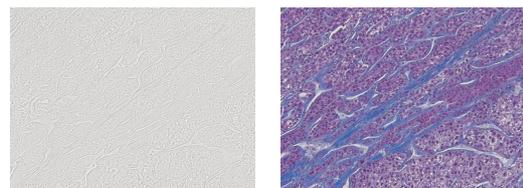


図 10 Tumor (がん患者) の肝病理標本

表 3 本研究における学習条件

学習データセット	無染色、MT 染色 6624 パッチずつ
テストデータセット	Normal 2 箇所、Tumor 2 箇所
パッチサイズ	256 pixel × 256 pixel × 5 channel
バッチサイズ	1
エポック数	50 (15 エポック以降学習率減衰)
学習率	Generator : 1×10^{-4} , Discriminator : 2×10^{-4}

提案手法による疑似染色結果を図 11 および図 12 に示す。図 11 は Normal、図 12 は Tumor の結果である。図 11 (d) と図 11 (e) から、提案手法は膠原線維の染め分け (青い領域) ができており、一方で図 11 (f) では膠原線維の染め分けができていない。これにより、偏光観察によって膠原線維が明瞭になり (図 11(b) の赤枠内)、偏光観察画像によって線維組織の特徴を抽出することができたと考えられる。また、微分干渉観察によって組織全体の明瞭化が行われ、線維組織、細胞核および細胞質の構造の違いを学習に組み込むことができたと考えられる。図 12(e) では、膠原線維の染め分けはできているが、図 12(f) の赤枠内を比較して、細胞核 (黒褐色の丸い領域) の境目が曖昧になっている。これは提案手法で同一領域における明視野観察画像、偏光観察画像、微分干渉観察画像間の位置合わせが不十分であり、画素単位でずれが生じていたことが原因として考えられる。

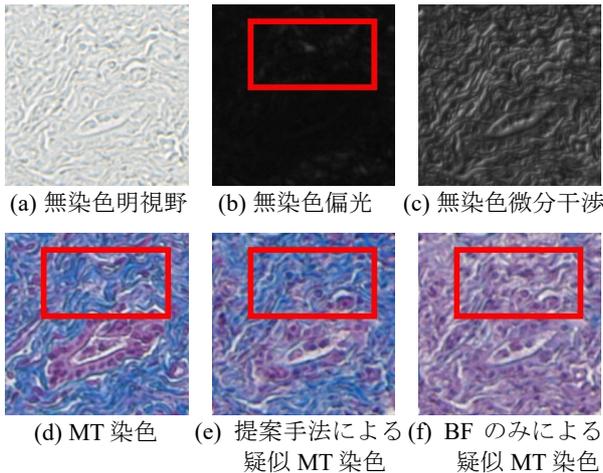


図 11 Normal 標本の疑似染色結果

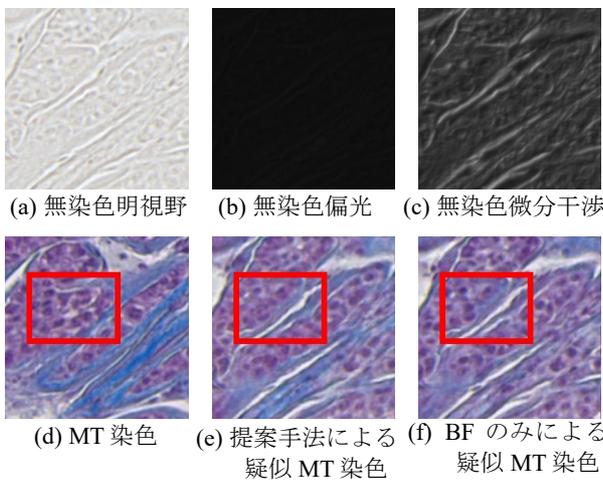


図 12 Tumor 標本の疑似染色結果

5. まとめと今後の課題

本研究では、無染色肝病理標本からの MT 疑似染色を行った。標本のイメージングでは明視野顕微鏡による明視野観察、偏光観察、微分干渉観察を行った。また、学習ネットワークモデルには CycleGAN を使用し、非ペア画像の学習を実現した。偏光観察画像および微分干渉観察画像によって膠原線維および組織構造全体の明瞭化が行われたため、組織の染め分けの精度向上が見られた。しかし、組織構成要素の境目が曖昧になってしまう結果があったことから、より正確な位置合わせおよび学習データセットの改善が必要であると考えられる。また、本研究では明視野観察分光画像を RGB 画像に変換して使用したが、分光画像は RGB 画像より詳細な情報が含まれているため、今後は分光画像を使用し、精度向上が見られるかを確認する。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP24K02952 および稲盛財団の助成を受けたものである。

参考文献

- [1] 水上 國雄, “新染色法のすべて”, 医歯薬出版株式会社, 1999.
- [2] 法村 真一, “染色性の管理”, 広島大学技術センター報告集, Vol.13, pp. 15-20, Aug. 2017.
- [3] B. Bai et al., “Deep learning-enabled virtual histological staining of biological samples”, *Light Sci Appl*, Vol. 12, No. 1, pp. 57-77, Mar. 2023.
- [4] Y. Li et al., “Virtual histological staining of unlabeled autopsy tissue”, *Nat Common*, Vol. 15, No. 1, pp. 1684, Feb. 2024.
- [5] N. Borhani et al., “Digital staining through the application of deep neural networks to multi-modal multi-photon microscopy”, *Biomed. Opt. Express*, Vol. 10, No. 3, pp. 1339, Mar. 2019.
- [6] Y. Zhang et al., “Digital synthesis of histological stains using micro-structured and multiplexed virtual staining of label-free tissue”, *Light Sci Appl*, Vol. 9, No. 1, pp. 78, May. 2020.
- [7] A. Picon et al., “Autofluorescence image reconstruction and virtual staining for in-vivo optical biopsying”, *IEEE Access*, Vol. 9, pp. 32081-32093, 2021.
- [8] Y. Rivenson et al., “PhaseStain: the digital staining of label-free quantitative phase microscopy images using deep learning”, *Light Sci Appl*, Vol. 8, No. 1, Feb. 2019.
- [9] P. Salehi et al., “Pix2Pix-based Stain-to-Stain Translation: A Solution for Robust Stain Normalization in Histopathology Images Analysis”, *MVIP*, pp.1-7, Feb. 2020.
- [10] C. Reyes-Aldasoro et al., “Virtualization of Tissue Staining in Digital Pathology Using an Unsupervised Deep Learning Approach”, *Digital Pathology*, Vol. 11435, pp. 47-55, 2019.
- [11] M. Wolman, “Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology”, *J Histochem Cytochem.*, Vol 23, No. 1, pp. 21-50, Jan. 1975.
- [12] I. Goodfellow et al., “Generative Adversarial Nets”, arXiv:1406.2661, 2014.
- [13] J.-Y. Zhu et al., ICCV, pp. 2242-2251, 2017.
- [14] K. He et al., “Deep Residual Learning for Image Recognition”, *CVPR*, pp.770-778, 2016.