

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	マルチスペクトル whole slide imaging のための画像解析に関する研究
Title(English)	A study on image analysis for multispectral whole slide imaging
著者(和文)	橋本典明
Author(English)	Noriaki Hashimoto
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第8875号, 授与年月日:2012年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:大山 永昭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第8875号, Conferred date:2012/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

マルチスペクトル Whole Slide Imaging のための
画像解析に関する研究

A study on image analysis for multispectral whole slide imaging

東京工業大学大学院総合理工学研究科
物理情報システム専攻

橋本典明

Noriaki Hashimoto

目次

第 1 章 序論	1
1.1 研究の背景と目的.....	1
1.2 本論文の構成.....	2
第 2 章 デジタル病理画像とマルチスペクトルイメージング	5
2.1 はじめに.....	5
2.2 病理診断とデジタル画像.....	5
2.2.1 病理診断とデジタル画像解析.....	5
2.2.2 Whole Slide Imaging.....	6
2.3 マルチスペクトルイメージング.....	7
2.3.1 マルチスペクトルイメージング.....	7
2.3.2 マルチスペクトルイメージングの病理応用.....	9
2.4 マルチスペクトル WSI システム.....	11
2.5 第 2 章のまとめ.....	13
第 3 章 マルチスペクトル画像色強調手法に関する検討	15
3.1 はじめに.....	15
3.2 マルチスペクトル画像色強調手法.....	15
3.2.1 マルチスペクトル画像色強調アルゴリズム.....	15
3.2.2 マルチスペクトル画像色強調アルゴリズムの改善.....	18
3.3 実験.....	20
3.3.1 病理画像応用.....	20
3.3.2 皮膚画像応用.....	26
3.3.3 リモートセンシング画像応用.....	31
3.4 色強調手法の高速化と GUI 実装.....	42

3.5 第3章のまとめ.....	45
第4章 デジタル染色手法に関する検討	47
4.1 はじめに.....	47
4.2 デジタル染色手法.....	47
4.2.1 先行研究におけるデジタル染色.....	47
4.2.2 色素量推定に基づくデジタル染色手法.....	48
4.3 実験.....	55
4.3.1 非負制約付き成分係数推定の評価.....	55
4.3.2 H単染色標本画像からのデジタルH&E染色.....	59
4.3.3 H単染色標本画像からのデジタルMT染色.....	61
4.4 第4章のまとめ.....	67
第5章 WSI品質管理のためのNo-reference画質評価	69
5.1 はじめに.....	69
5.2 WSI品質管理のためのNo-reference画質評価手法.....	69
5.3 実験.....	73
5.3.1 客観評価指標を用いた実験.....	73
5.3.2 主観評価指標を用いた実験.....	77
5.3.3 WSIスキャナへの応用.....	78
5.4 第5章のまとめ.....	82
第6章 マルチスペクトルWSIの作製	83
6.1 はじめに.....	83
6.2 マルチスペクトルWSI入力システムの開発.....	83
6.2.1 低倍率マルチスペクトルWSI撮影システム.....	83
6.2.2 高倍率マルチスペクトルWSI撮影システム.....	86
6.3 マルチスペクトル画像への画質評価手法応用.....	89
6.4 標本全体への画像解析手法適用.....	91

6.4.1 マルチスペクトル画像色強調の適用	91
6.4.2 デジタル染色の適用	93
6.5 第6章のまとめ.....	97
第7章 結論	99
謝辞	101
参考文献	103
研究業績	109

目次

図 1.1 本論文の構成.....	3
図 2.1 WSI スキャナの例	6
図 2.2 WSI ビューアの例	7
図 2.3 マルチスペクトルイメージング機器例.....	8
図 2.4 6バンド動画カメラの構成.....	9
図 2.5 ImSpector 撮影システムの構成.....	9
図 2.6 マルチスペクトル顕微鏡システム.....	9
図 2.7 色素量推定.....	10
図 2.8 染色濃度調整.....	11
図 2.9 デジタル染色.....	11
図 2.10 マルチスペクトル WSI システムの概要	12
図 3.1 マルチスペクトル画像色強調手法の流れ.....	16
図 3.2 16バンド顕微鏡システムの分光感度特性.....	20
図 3.3 H&E 染色標本画像（16バンド撮影）	21
図 3.4 H&E 染色標本の各組織	21
図 3.5 H&E 染色標本中における各組織の分光透過率	22
図 3.6 H&E 染色標本中における各組織の残差成分（第 6 基底まで使用）	22
図 3.7 病理画像色強調結果（従来手法）	23
図 3.8 MT 染色標本画像（16バンド撮影）	23
図 3.9 MT 染色標本中における線維領域の分光透過率.....	24
図 3.10 病理画像色強調結果（提案手法 I）	24
図 3.11 病理画像色強調結果（提案手法 II）	25

図 3.12 16 バンド静止画カメラの分光感度特性	26
図 3.13 皮膚画像（16 バンド撮影）	27
図 3.14 皮膚画像色強調結果（従来手法）	28
図 3.15 16 バンド目における残差成分（第 3 基底まで使用）	28
図 3.16 色相マッピングの流れ	29
図 3.17 皮膚画像色強調結果（提案手法 III）	30
図 3.18 圃場画像（8 月撮影）	31
図 3.19 屋外ハイパースペクトル画像撮影システム	32
図 3.20 マクベスカラーチェッカー	32
図 3.21 室内ハイパースペクトル撮影システム	33
図 3.22 圃場画像内の各領域	33
図 3.23 圃場画像色強調結果（提案手法 I）	34
図 3.24 圃場画像における各領域の残差成分	35
図 3.25 圃場画像色強調結果（部分拡大）	36
図 3.26 圃場画像における各領域の分光反射率	36
図 3.27 圃場画像（異なる時期に撮影）	37
図 3.28 圃場画像色強調結果（650nm を強調）	37
図 3.29 圃場画像色強調結果（650nm を強調，部分拡大）	38
図 3.30 異なる時期に撮影された圃場画像における各領域の分光反射率	39
図 3.31 異なる時期に撮影された圃場画像における各領域の残差成分	39
図 3.32 樹木画像	40
図 3.33 樹木画像色強調結果（695nm を強調）	40
図 3.34 樹木画像における各領域の分光反射率	41
図 3.35 樹木画像における各領域の残差成分	42
図 3.36 樹木画像色強調結果（705nm を強調）	42
図 3.37 GUI 実行画面	44

図 4.1 線維化組織における組織構造.....	48
図 4.2 H 単染色標本画像.....	50
図 4.3 H 単染色標本における各組織.....	51
図 4.4 H 単染色標本における細胞質と細胞核の分光吸光度（最大値を 1 に正規化）	51
図 4.5 H 単染色標本における細胞質と線維の分光吸光度（最大値を 1 に正規化）	52
図 4.6 MT 染色標本における各組織.....	52
図 4.7 Ki-67 染色肝臓標本画像（TMA より撮影）	54
図 4.8 H&E 染色肝臓標本画像（TMA より撮影）	54
図 4.9 H&E 染色肝臓標本画像（VariSpec 撮影，40 倍）	55
図 4.10 H&E 染色標本画像から推定された成分係数画像	57
図 4.11 推定成分係数から復元された H&E 染色標本画像	58
図 4.12 分光吸光度残差画像.....	59
図 4.13 H 単染色肝臓標本画像（VariSpec 撮影画像，20 倍）	60
図 4.14 E 単染色肝臓標本画像（VariSpec 撮影画像，20 倍）	60
図 4.15 デジタル H&E 染色画像	61
図 4.16 H&E 染色肝臓標本画像（連続切片）	61
図 4.17 MT 染色肝臓標本画像（連続切片）	62
図 4.18 H 単染色標本の各組織から推定された細胞核と赤血球の成分係数	62
図 4.19 H 単染色標本の各組織から推定された細胞質と線維の成分係数	63
図 4.20 デジタル MT 染色画像.....	64
図 4.21 MT 染色標本画像から推定された線維の成分係数.....	65
図 4.22 MT 染色標本画像からの領域抽出結果.....	66
図 4.23 H 単染色標本画像からの領域抽出結果.....	67
図 5.1 勾配方向のラベリング.....	70
図 5.2 エッジ幅の算出方法.....	71
図 5.3 ノイズ強調処理の例.....	72

図 5.4	マウスエンブリオ標本.....	73
図 5.5	劣化画像のシミュレーション.....	74
図 5.6	各評価値と MSE の比較.....	74
図 5.7	画質評価値と MSE の比較 (NanoZoomer 2.0-HT, 20 倍)	75
図 5.8	画質評価値と MSE の比較 (MIRAX SCAN, 20 倍)	76
図 5.9	画質評価値と MSE の比較 (NanoZoomer 2.0-HT, 40 倍)	77
図 5.10	主観評価実験のスクリーンショット	77
図 5.11	WSI への画質評価手法応用における処理手順.....	79
図 5.12	画質評価値と主観評価値の関係.....	79
図 5.13	マウスエンブリオ標本 (図 5.4 の連続切片)	80
図 5.14	画質評価結果の可視化画像.....	80
図 5.15	再スキャンされた画像に対する画質評価結果の可視化画像.....	81
図 6.1	自動 XY ステージ.....	84
図 6.2	撮影に使用した H&E 染色肝臓標本.....	84
図 6.3	各領域で撮影されたマルチスペクトル画像.....	84
図 6.4	テンプレートマッチングを用いた張り合わせ	85
図 6.5	作製した低倍率マルチスペクトル WSI.....	85
図 6.6	作製した低倍率マルチスペクトル WSI (部分拡大)	86
図 6.7	サムネイルを用いたフォーカス決定領域の指定	87
図 6.8	撮影に使用した肝臓 TMA 標本.....	87
図 6.9	作製した高倍率マルチスペクトル WSI.....	88
図 6.10	作製した高倍率マルチスペクトル WSI (部分拡大)	88
図 6.11	作製した高倍率マルチスペクトル WSI (550nm, フォーカス曲面使用)..	90
図 6.12	H&E 染色標本中における赤血球領域画像.....	91
図 6.13	H&E 染色標本中における各組織の残差成分 (第 8 基底まで使用)	92
図 6.14	低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果 (提案手法 I)	92

図 6.15 低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果 (部分拡大)	93
図 6.16 低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果 (境界部分)	93
図 6.17 Ki-67 染色標本における陽性細胞核 (褐色)	94
図 6.18 作製した高倍率マルチスペクトル WSI (H&E 染色)	95
図 6.19 デジタル H&E 染色画像(胆管細胞癌 Grade2).....	95
図 6.20 デジタル H&E 染色画像(部分拡大).....	96
図 6.21 デジタル H&E 染色画像(細胞核をヘマトキシリンで表現).....	97

表目次

表 3.1 細胞質と線維の間における色差の比較.....	26
表 3.2 皮膚領域と静脈領域の間における色差の比較.....	30
表 3.3 処理時間の比較(単位は sec.).....	43
表 3.4 実装した機能.....	44
表 4.1 MSE および色差の比較	59
表 4.2 定量化データの比較.....	66

第 1 章 序論

1.1 研究の背景と目的

病理診断では、染色した病理標本を病理医が顕微鏡で観察することにより、良悪性の判定や病変の進行度、病態の決定を行う。これらの診断結果をもとに患者の治療法の選択や予後を決めることから病理診断は臨床診断に対して重要な役割を果たすため、診断精度の向上が求められている。しかしながら病理診断は病理医の知識や経験に基づいた主観的な判断となるため、異なる病理医の間、さらには同一の病理医においても診断結果のばらつきが報告されている。このような問題から、定量的な指標を用いた再現性の高い病理診断の要求が高まっており、デジタル病理画像を用いた診断支援に対する様々な画像解析技術が開発されている。デジタル病理画像の入力技術として画像全体を撮影しデジタル画像化する **Whole Slide Imaging** が注目されており、様々なベンダーによる **Whole Slide Imaging** スキャナが開発はデジタル病理の普及に貢献している。

一方、デジタル画像分野においてマルチスペクトルイメージングを用いた画像解析が広く研究されている。従来、リモートセンシング分野においてマルチスペクトル画像が画像解析用途として幅広く利用されていたが、応用分野の拡大にしたがい現在では病理画像への応用研究も行われている。スペクトルに基づく色再現を行うことにより表示デバイスや観察環境に応じた適切な色で画像の表示を可能とし、スペクトル情報を利用することで標本による染色のばらつきなども補正することができる。また **RGB** 画像では区別することのできない色情報を使用することで、より精度の高い定性・定量的な画像解析を行うことが可能になる。

上記の **Whole Slide Imaging** とマルチスペクトル画像を組み合わせることにより、さらに高度なデジタル病理診断および診断支援を行うことが期待されている。現在、マルチスペクトル画像を用いた多くの病理画像解析技術が開発されているが、現在ではカメラにより撮影された小領域の視野のみにしか処理を適用できず、実応用における有効性を示すことが難しい。

本論文ではマルチスペクトル画像と **Whole Slide Imaging** を組み合わせた、マルチスペクトル **Whole Slide Imaging** を想定した画像解析について検討を行い、これまで提案されてきたマルチスペクトル画像解析技術において問題とされていた点についてアルゴリズムの改善や新たな手法の提案を行う。また現行の **Whole Slide Imaging** スキャナは **RGB** ベースの

ものが主流であり、マルチスペクトル画像を取得可能な **Whole Slide Image** 入力システムは現時点では流通していないため、提案した画像解析技術を標本全体に対して適用することはできない。そこで既存のマルチスペクトル顕微鏡システムを利用した **Whole Slide Image** 撮影システムの開発を行う。また信頼性の高い画像処理結果を得るためには高画質なマルチスペクトル **Whole Slide Image** が必要となるため、入力システムの一部として画質評価手法を用いた品質管理に関する検討を行う。最終的に入力システムにより得られるマルチスペクトル **Whole Slide Image** 全体に対して処理を適用することによって、実際にシステムが完成した際の有効性を示すことが期待される。

1.2 本論文の構成

本論文の構成を図 1.1 に示す。

第 2 章では、病理分野の現状およびマルチスペクトルイメージングについて概説し、将来的に開発が期待される技術としてマルチスペクトル **Whole Slide Imaging** の説明を行う。

第 3 章では、一般的なマルチスペクトル画像解析技術として、画像色強調について検討を行い従来手法からの拡張を行う。先行研究により強調結果を確認していた病理画像、皮膚画像といった医用分野の画像に加えて、一般的にマルチスペクトル画像が用いられているリモートセンシング分野の画像を応用先として考慮することにより手法の有効性を示す。

第 4 章では、病理画像に特化したマルチスペクトル画像解析技術として、色素量推定に基づいたデジタル染色手法の提案を行う。ヘマトキシリン単染色標本からのデジタルヘマトキシリン・エオジン染色を提案し、同様のアプローチを用いてヘマトキシリン単染色標本からマッソントリクローム染色標本の作製へと手法の拡張を行う。

第 5 章では、**Whole Slide Image** 品質管理のための画質評価に関する検討を行う。ここでは **RGB** 画像をベースに、画像中のぼけとノイズを対象とした、参照画像を用いない画質評価手法の提案を行う。客観評価指標および主観評価指標を用いた実験により提案した画質評価手法の妥当性を確認し、さらに **Whole Slide Imaging** スキャナにおける応用例を示す。

第 6 章では、マルチスペクトル **Whole Slide Image** の作製を行う。低倍率および高倍率での **Whole Slide Image** 撮影システムの開発を行い、実際に作製されたマルチスペクトル **Whole Slide Image** に対して前章で提案した画像解析手法を適用し、提案技術の有効性を確認する。また第 5 章で提案した画質評価手法をマルチスペクトル画像へ適用するための方法に関しても検討を行う。

最後に第 7 章で本論文をまとめる。

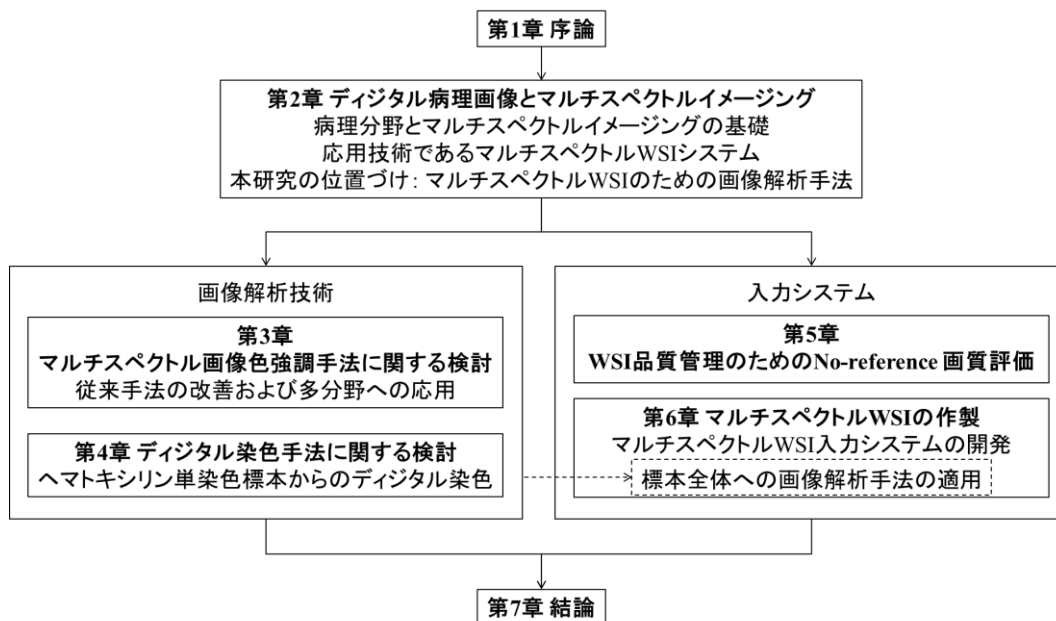


図 1.1 本論文の構成

第2章 デジタル病理画像とマルチスペクトルイメージング

2.1 はじめに

第2章では、病理分野およびマルチスペクトルイメージングについて概説を行う。病理分野における問題点などを整理し、デジタル化の必要性やそれらに必要となる病理画像のイメージング手法について説明を行う。また画像分野一般で広く用いられているマルチスペクトルイメージング技術および病理分野における応用研究について、本研究室で行われてきた先行研究を含め紹介する。それらを背景として将来的に実現が期待されるマルチスペクトル Whole Slide Imaging システムについて概要を説明し、本研究の位置づけを説明する。

2.2 病理診断とデジタル画像

本節では病理診断の現状と問題点について述べ、デジタル病理画像のイメージング技術の説明を行う。

2.2.1 病理診断とデジタル画像解析

病理診断では、染色した病理標本を病理医が顕微鏡で観察することにより、良悪性の判定や病変の進行度、病態の決定を行う。これらの診断結果をもとに患者の治療法の選択や予後を決めることから病理診断は臨床診断に対して重要な役割を果たすため、診断精度の向上が求められている[1,2]。診断精度の標準化は、複数の病理医により同一の標本を観察することによるダブルチェックや、より専門性の高い医師からのセカンドオピニオンにより改善が可能であるとされているが、実際には迅速な診断を求められる場合や輸送コストがかかることが課題とされている。さらに前立腺癌における診断では Gleason スコアと呼ばれる分化の違いを表した5段階の評価値を使用しているが、同一の病理医の間においてさえ診断結果のばらつきが生じることが報告されており、再現性のある診断結果を得ることが難しいとされている[3,4]。また同様の問題は乳がんなど他の病気においても指摘されている[5]。このような問題を解決するために、デジタル画像を用いた病理画像解析技術

が開発されており、定性・定量的な指標を利用した病理診断支援が期待されている[6].

2.2.2 Whole Slide Imaging

従来ではアーカイブや遠隔診断、また画像解析のために、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラによりデジタル病理画像の撮影を行っていた[7,8]. しかしながらデジタルカメラを用いた撮影では一部の領域のみしか取得しないため、実際の関心領域(Region of Interest, ROI)との不一致などの可能性が考えられた. 近年では、ガラス標本全体をデジタル画像化する Whole Slide Imaging(WSI)が注目されており、様々なベンダーにより開発された WSI スキャナが市場に参入している[9-12]. 図 2.1 に WSI スキャナの例を示す[13,14]. これらのスキャナによりデジタル化された標本画像は端末を通じてディスプレイに表示され、マウスやキーボード制御により領域の移動や倍率の変更といったような通常の顕微鏡と同様の操作を行うことができる. 病理標本のデジタル化に伴い、標本管理・配布・複製の容易化といったことに加え、遠隔病理診断への利用などといったメリットが挙げられる. またデジタル画像解析技術による定性・定量的な情報を用いた診断支援への応用も期待されており、WSI に向けた病理画像解析技術の研究も活発になってきている[15-17]. 出力側であるビューアシステムの開発も進んでおり、すべての WSI スキャナの撮影画像に対応したビューア[18]の開発などが行われているほか、現在ではタブレット用のアプリケーション[19]も公開されている. 図 2.2 に WSI ビューアの外観を示す.



(a) Aperio SCANSCOPE XT



(b) 浜松ホトニクス NanoZoomer-2.0HT

図 2.1 WSI スキャナの例

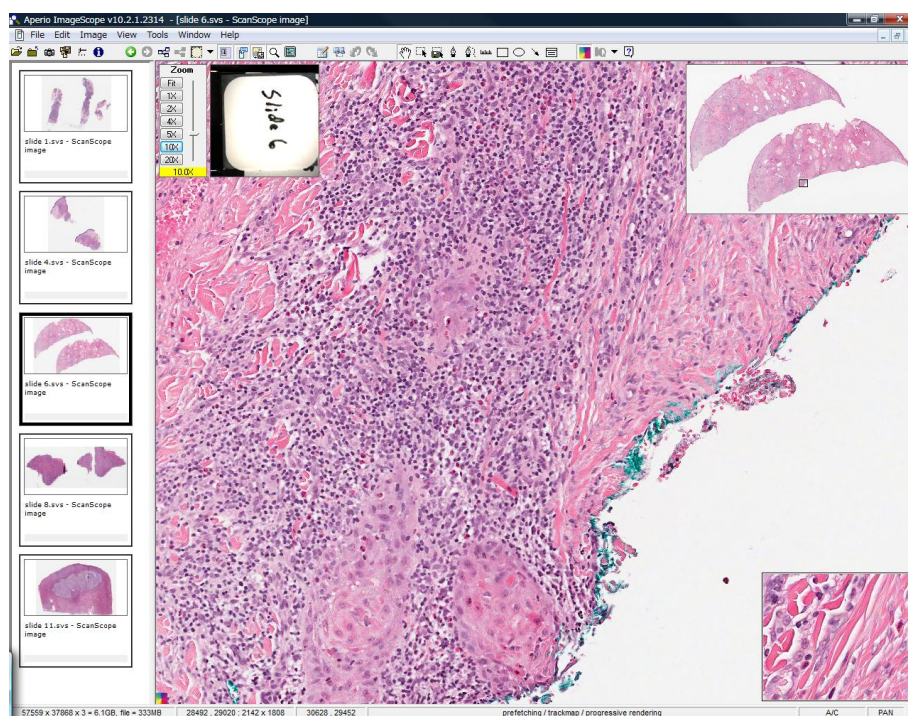


図 2.2 WSI ビューアの例

2.3 マルチスペクトルイメージング

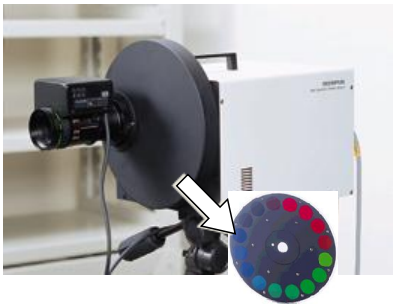
本節では、マルチスペクトルイメージング技術の紹介を行う。デジタル画像分野における一般的なマルチスペクトルイメージング技術に加え、近年増加している病理分野への応用に関して紹介を行う。また入力系のみならず、撮影されたマルチスペクトル画像を用いた病理画像解析技術についても紹介する。

2.3.1 マルチスペクトルイメージング

現行のデジタルカメラは RGB の 3 バンドにより構成されているが、より多くのバンドをもつマルチスペクトルカメラの開発が行われている。また数百といったように多くのチャンネルをもつ場合、ハイパースペクトル画像と呼ばれることもある。マルチスペクトル画像は、従来ではリモートセンシング分野においてハイパースペクトル画像として画像解析用途に広く使用されていたが[20-22]、近年では様々な分野への応用が行われている。取得された分光情報の可視化に関する検討もされており、可視光帯域を対象とした忠実な色再現[23-25]や赤外などの不可視帯域も含む可視化手法の検討が行われている[26-28]。特にスペクトルに基づく色再現では、物体の分光反射率（透過率）を利用するため、撮影時と異なる光源を用いた場合の色再現も可能となる。

図 2.3 にイメージング機器の例を示す。図 2.3(a)は回転フィルタを利用した 16 バンド静

止画カメラであり，円形に配置されたカラーフィルタを回転させながら CCD カメラで同期撮影を行うことにより，各波長帯域に対応したグレースケール画像を取得することが可能となる[29]．しかしながら回転フィルタを利用した時分割撮影の場合，静止物しか撮影することができず人物などのような動物体の撮影は困難とされている．そこで図 2.3(b)のような 2 台の RGB カメラを組み合わせた 6 バンド動画カメラの開発も行われている[30]．6 バンド動画カメラでは，レンズに入射した光がハーフミラーにより分割され，異なる特性をもつフィルタを通じて 2 台の RGB カメラに入力される．このようにして得られる 3 バンド信号値を 2 つ組み合わせることにより 6 バンド動画撮影を実現している（図 2.4）．また液晶チューナブルフィルタを用いたイメージングも行われている．図 2.3(c)は液晶チューナブルフィルタ VariSpec(Caliper 社)を用いた撮影装置であり，このフィルタでは電氣的に透過波長を制御することができ，任意の波長の光を 1nm 単位で取り出すことができる[31]．上記のイメージング手法はバンドごとに撮影を行う面順次方式の手法であるが，空間分割によるイメージング手法も利用されている．図 2.3(d)に示す ImSpector(Specim 社)を用いたイメージングでは，プリズムとグレーディングを利用したシステム構成を採用しており，同時刻におけるライン状エリアのスペクトル分布を取得することが可能となっている（図 2.5）[32]．



(a) 16 バンド静止画カメラ



(b) 6 バンド動画カメラ



(c) VariSpec 撮影システム



(d) ImSpector 撮影システム

図 2.3 マルチスペクトルイメージング機器例

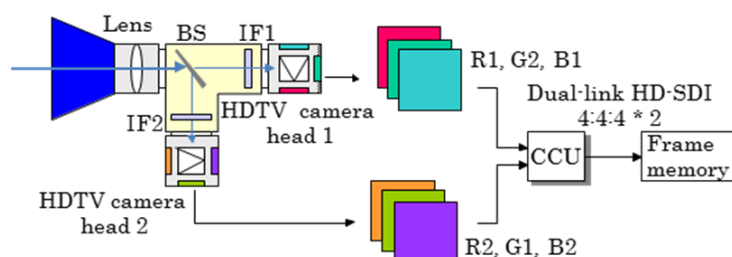


図 2.4 6 バンド動画カメラの構成

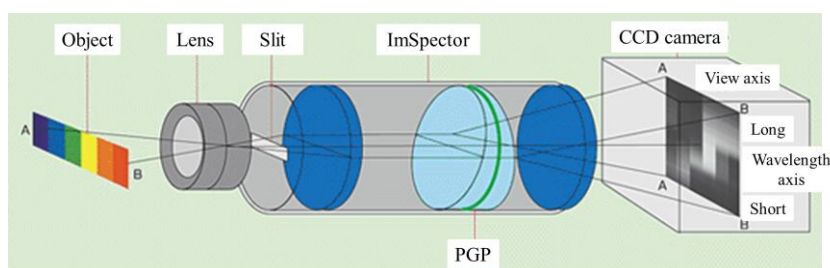


図 2.5 ImSpector 撮影システムの構成

2.3.2 マルチスペクトルイメージングの病理応用

病理分野においても，顕微鏡にフィルタ等を取り付けることによりマルチスペクトル画像の撮影を可能としている．図 2.6 に顕微鏡を用いたマルチスペクトルイメージングシステムの外観を示す．図 2.6(a)は図 2.3(a)と同様に回転フィルタを用いた 16 バンド顕微鏡システムであり，カラーフィルタを回転させながら CCD カメラで同期撮影を行うことにより各バンドの画像を取得する[33]．また図 2.6(b)に示すように前節で紹介した VariSpec を使用することにより，さらに多くの任意波長を撮影することが可能となる．10 バンド程度の回転フィルタを用いたマルチスペクトル顕微鏡システムも使用されているが，一般に市販されていることやバンド数を任意に変化させることができることから，現在では VariSpec の方が広く利用されている．



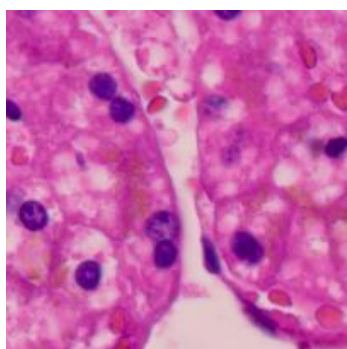
(a) 16 バンド顕微鏡システム



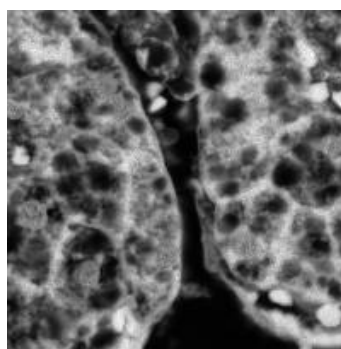
(b) VariSpec 顕微鏡システム

図 2.6 マルチスペクトル顕微鏡システム

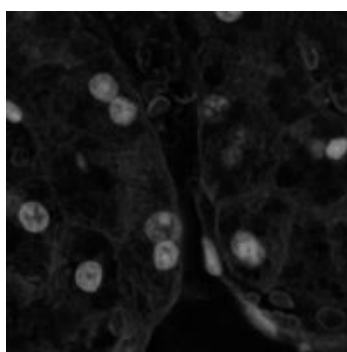
これらのイメージング技術を用いて、マルチスペクトル病理画像に対する画像解析技術の研究が行われている。他の分野でも研究されているスペクトルアンミキシング（病理では多重染色分離）やセグメンテーション、組織分類などが代表的な画像解析手法である[34-36]。本研究室においても先行研究として、色素量推定（図 2.7）[37,38]、さらに色素量推定結果を利用した染色濃度調整（図 2.8）[39,40]、組織分類結果に基づきヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色標本画像からマッソントリクローム(MT)染色標本画像を疑似的に生成するデジタル染色（図 2.9）[33]などが行われてきた。マルチスペクトル画像を用いた画像解析では、従来の RGB 画像システムでは区別できない色の違いなどを利用できるため、より高精度な解析結果を得ることが可能となる。



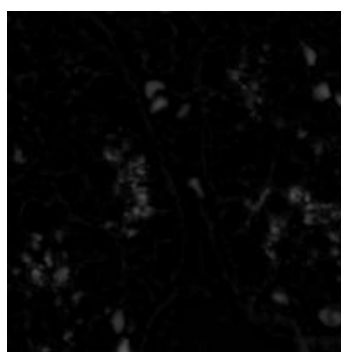
(a) H&E 染色標本画像



(b) エオジン色素量画像

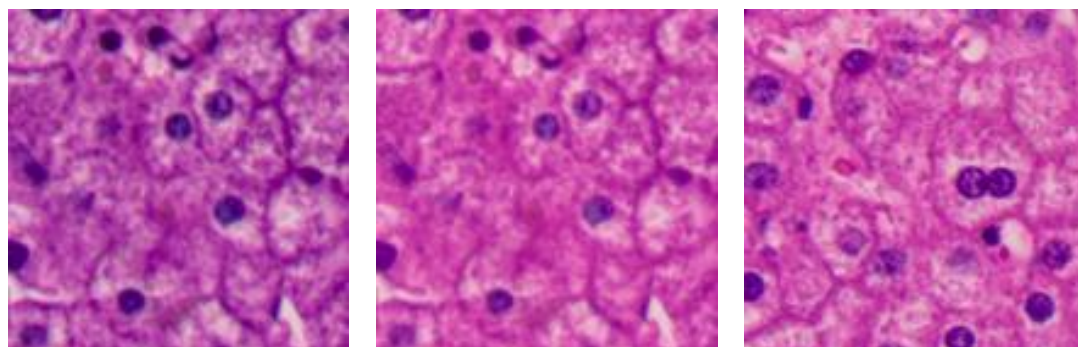


(c) ヘマトキシリン色素量画像



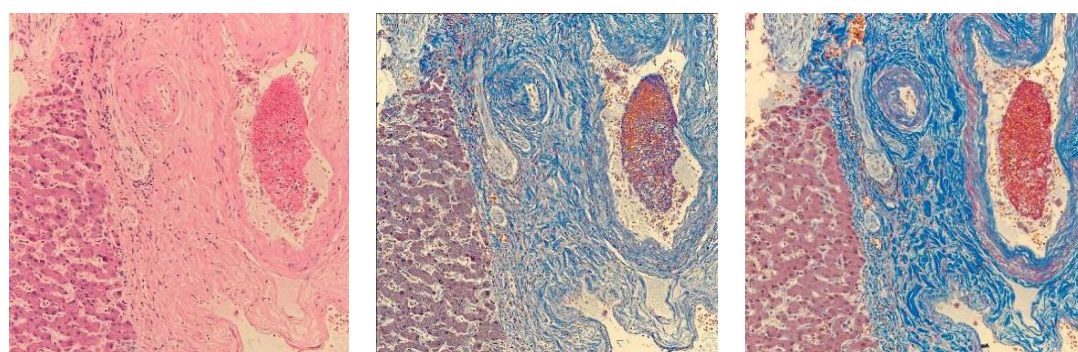
(d) 赤血球色素量画像

図 2.7 色素量推定



(a) 過剰染色標本画像 (b) 染色濃度調整結果 (c) 標準染色標本画像 (参照画像)

図 2.8 染色濃度調整



(a) H&E 染色標本画像 (b) デジタル MT 染色標本画像 (c) MT 染色標本画像

図 2.9 デジタル染色

2.4 マルチスペクトル WSI システム

前述した 2 つの技術, WSI およびマルチスペクトル画像を組み合わせる構成されるマルチスペクトル WSI システムが将来的な技術として期待される. 想定するシステムの概要を図 2.10 に示す.

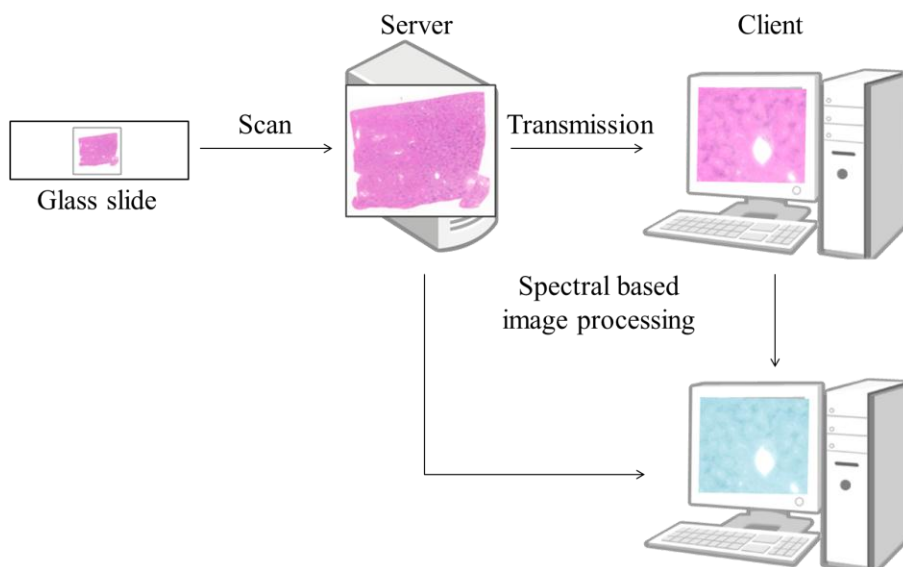


図 2.10 マルチスペクトル WSI システムの概要

入力システムでは前節で紹介したマルチスペクトルイメージングにより標本画像の撮影を行う。撮影されたマルチスペクトル WSI はサーバに保存され、端末を通じてユーザがスライドの観察を行う。観察の際に、通常時は RGB 色再現画像で標本の観察を行い、ユーザの要求に従い表示中の領域に対してスペクトルに基づいた画像処理を施し結果画像を表示する、というのが主な使用方法となる。

しかしながら現時点ではマルチスペクトル画像入力に対応した WSI スキャナがないため、このようなシステムは実現していない。またマルチスペクトル WSI が実現できた場合においても、どのような処理を実装すればマルチスペクトル画像を使用することの価値を示すことができるか、ということに関して考える必要がある。

そこで本研究ではマルチスペクトル WSI に向けた画像解析技術について検討を行う。撮影されたマルチスペクトル WSI をビューアにより観察する際、各バンドの単バンド画像や各画素のスペクトル分布を見ただけでは、画像中のどの領域がどの波長に特徴を持っているか、ということは判別しづらい。本研究室で提案されたマルチスペクトル画像色強調[41]では画像中のスペクトル特徴を可視化するのに非常に有効な手法であり、本手法を実装することによりスペクトルの価値を示すことができると考えられる。また病理応用に特化した画像解析手法として本研究室ではデジタル染色[33]が提案されており、このような処理を標本全体に対して適用することで、システムが完成したときのインパクトが病理医などに対しても簡単に示されることが期待される。本論文では上記2つの画像解析手法に関して研究し、手法の拡張・改善を行う。

さらにマルチスペクトル WSI 入力システムに関しても検討を行い、マルチスペクトル WSI を実際に作製し標本全体に画像解析手法を適用することにより、システムが実現した

際の有効性を示すことを目的とする。

2.5 第2章のまとめ

本章では、病理分野の現状とマルチスペクトルイメージング技術について解説するとともに、将来的に期待される技術としてマルチスペクトル WSI システムの概要と本研究の位置づけについて説明した。

現在の病理分野におけるデジタル化は未だ発展途上ではあるものの、WSI スキャナの普及は進んできている。現時点では免疫組織化学(Immunohistochemistry, IHC)染色標本のみを対象とした臨床応用可能な画像解析技術も開発されており[13]、様々な研究機関で画像解析技術の研究が行われていることからデジタル病理のさらなる発展が期待される。一方でマルチスペクトル画像も従来と比べて簡易な撮影手法が提案されてきており、マルチスペクトルイメージングが注目されている。以上のことから、これらを組み合わせたマルチスペクトル WSI システムは十分に実現可能な技術であり、また高精度な診断支援を行うためにも必要な、価値のある技術であると考えられる。

しかしながらマルチスペクトル WSI システムにはまだ課題が多く残されており、中でもスペクトルで画像を得ることの優位性を示すことは重要である。そこで次章ではマルチスペクトル画像中のスペクトル特徴を可視化する手法である、マルチスペクトル画像色強調について検討を行う。

第3章 マルチスペクトル画像色強調手法に関する検討

3.1 はじめに

本章ではマルチスペクトル WSI のためのスペクトルベース画像処理としてマルチスペクトル画像色強調を扱う。本研究室で提案されたマルチスペクトル画像色強調は画像の主成分からのずれを利用して、指定された波長に特徴をもつ領域を強調する手法であり、スペクトルの特徴を観察するために役立つ[41]。しかしながら従来手法における色強調アルゴリズムでは、スペクトル特徴が赤外などの不可視帯域に存在する場合やハイパースペクトル画像のように極めて多くのバンドをもつ画像に対して十分な効果を得ることができなかった。ここでは色強調手法を拡張し、このような問題の解決を図る。また従来では病理画像、皮膚画像といった医療応用の画像にのみ処理を適用してしたが、一般的にマルチスペクトル画像が利用されているリモートセンシング画像への応用を行うことで、手法の有効性を示す。また実装を考慮した高速化アルゴリズムの定式化を行い、提案アルゴリズムに従いグラフィックユーザインターフェース(GUI)を実装し処理時間について比較実験を行う。

3.2 マルチスペクトル画像色強調手法

マルチスペクトル画像色強調はスペクトルの特徴を可視化することができる効果的な手法である。既存の画像色強調手法として多くの手法が提案されているが[42-44]、本研究室で提案されたマルチスペクトル画像色強調手法は画像の主成分との色のずれを利用して特定の波長帯域を強調することにより、画像中の平均の色を保ったままスペクトルの特徴を観察することができる[41]。特に医療などの分野においては強調した領域以外の箇所の色も重要となるケースがあると考えられる。色強調によって得られた既知の情報を利用したスペクトル処理によって領域抽出などのアプリケーションへの応用も期待される。

3.2.1 マルチスペクトル画像色強調アルゴリズム

色強調アルゴリズムは従来手法[41]に基づき、上位Karhunen-Loève (KL)基底によって表さ

れた信号値と元の信号値の差分を利用することにより、主成分の色を変化させずに画像の強調を行う。手法のフローチャートを図3.1に示す。

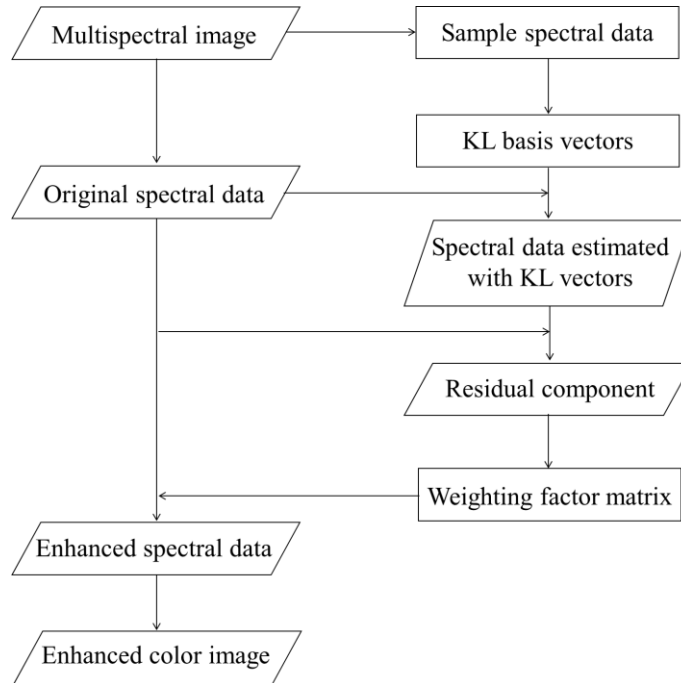


図 3.1 マルチスペクトル画像色強調手法の流れ

まず、画像から主成分を求めるための **KL** 基底ベクトル（固有ベクトル）を算出する。ここでデータの取得方法には、画像全体の信号値を使用する方法[41]と任意のサンプルデータを使用する方法[45]が挙げられる。例えば画像中に少ない割合で含まれる特異な領域を強調したい場合には前者を、またあらかじめ無視してよい箇所が決まっている場合には後者を使用するなどが考えられる。こうして得られたサンプルデータから共分散行列を作成し、**KL** 基底ベクトルを求める。

N バンドのマルチスペクトル画像を考える。 i 番目の **KL** 基底ベクトルを \mathbf{u}_i 、共分散行列の算出に使用したサンプルデータの平均値ベクトルを $\bar{\mathbf{g}}$ とすると、画素 j における N 次元の基準ベクトルは、

$$\mathbf{s}_j = \sum_{i=1}^m \alpha_{ij} \mathbf{u}_i + \bar{\mathbf{g}} \quad (3.1)$$

と表わされる。ここで m は使用する **KL** 基底の本数 ($m < N$)、 α_{ij} は i 番目の **KL** 基底ベクトルの展開係数であり、画素 j の画素ベクトル \mathbf{g}_j (N 次元) を用いて、

$$\alpha_{ij} = \mathbf{u}_i^T (\mathbf{g}_j - \bar{\mathbf{g}}) \quad (3.2)$$

と求まる. \mathbf{s}_j と重み行列 \mathbf{W} を用いて, 強調されたマルチスペクトル画像の画素ベクトルは,

$$\mathbf{g}_{e_j} = \mathbf{W}(\mathbf{g}_j - \mathbf{s}_j) + \mathbf{g}_j \quad (3.3)$$

となる. 基底の本数 m の選択方法は基底算出に用いたデータにより変化し, 主要な成分がある程度表せる本数を使用することが望ましい. 一方で基底の数を多くしすぎた場合, すべての画素において原信号が十分に表現できてしまい, 残差成分としてノイズが生じるため上手く特徴を抽出することができない. よって固有値の累積寄与率などを参照し適切な本数を選択することが処理を行う上で重要となる.

強調するバンドを n バンド目としたとき, 従来手法における $N \times N$ の行列 \mathbf{W} の p 行 q 列における各要素 $[\mathbf{W}]_{pq}$ を次のように定める,

$$[\mathbf{W}]_{pq} = \begin{cases} k & \text{if } p = q = n \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3.4)$$

ここで k は使用する残差の大きさに応じた係数である.

この手法は特徴をもたない領域は元の色で表示されることを目的として提案されているため, 可視光域の分光情報を用いた色再現により可視化される. 上記の式により強調されたマルチスペクトル画像信号値 \mathbf{g}_{e_j} はスペクトル推定[46]により分光反射率 (透過率) へと変換され, 視覚系の等色関数や照明光データを用いた色再現により, RGBカラー画像として出力される. 物体の L 次元の分光反射率 \mathbf{f} (L は波長方向のサンプリング数) とシステム関数 \mathbf{H} ($N \times L$ 次元行列) からなる線形システムにより得られる N バンド画像信号値 \mathbf{g} の関係が次式,

$$\mathbf{g} = \mathbf{H}\mathbf{f} \quad (3.5)$$

で表されるとき, Wiener推定を用いて推定される分光反射率は,

$$\hat{\mathbf{f}} = \mathbf{R}_f \mathbf{H}^T (\mathbf{H} \mathbf{R}_f \mathbf{H}^T)^{-1} \mathbf{g} \quad (3.6)$$

と求まる. ここで \mathbf{R}_f は対象物体の分光反射率の相関行列であり, 本論文では分光反射率を1次マルコフモデルと仮定し, 相関行列 \mathbf{R}_f を次式,

$$\mathbf{R}_{\text{Markov}}(\rho) = \begin{pmatrix} 1 & \rho & \rho^2 & \dots & \rho^{L-1} \\ \rho & 1 & \rho & \dots & \rho^{L-2} \\ \rho^2 & \rho & 1 & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \rho \\ \rho^{L-1} & \rho^{L-2} & \dots & \rho & 1 \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

で表すこととする. ここでスペクトルが十分になめらかであることを仮定し, $\rho = 0.999$ とする. 推定された分光反射率あるいは透過率に照明光, 等色関数をかけ, XYZからRGBへの変換行列を乗算することによりディスプレイに表示するカラー画像を得る. なおハイパースペクトル画像のように十分な波長サンプリング数 (可視光域を5nm間隔で撮影など) を持っている場合にはスペクトル推定は行わず, 同じ次元数でサンプリングされた照明光と

等色関数を用いて色再現を行う。色再現に関するこれらの処理は線形行列演算のみで表現することができるため、実際の処理は $3 \times N$ 次元の変換行列の乗算となる。本論文に載せているマルチスペクトル画像は色再現の際の照明光としてD65光源を、また等色関数としてCIE 1931 XYZ等色関数を使用し、sRGB空間に変換したものである。

3.2.2 マルチスペクトル画像色強調アルゴリズムの改善

前節でマルチスペクトル画像色強調の従来手法について説明を行ったが、従来手法中の式(3.4)からなる重み係数行列を使用した場合、効果的な強調結果を得られない可能性がある。例えば強調に指定した波長帯域が近赤外などの不可視帯域であった場合、本手法では可視光域を用いた色再現により可視化を行うため、不可視帯域の信号値がどれだけ大きくなったとしても色再現した画像に影響を与えることはない。またハイパースペクトル画像のように5nmや10nm間隔で可視光域がサンプリングされている場合、1つの波長帯域の信号値が大きくなった場合においても等色関数を乗算した結果に大きな影響を与えず、出力のRGB画像では強調箇所における色の変化を確認することができない。

そこで重み係数行列の設計を変更し、特徴を抽出するための波長帯域と信号値の増減に使用する色をそれぞれ任意に選択することを考える。重み係数行列 \mathbf{W} の列は特徴を抽出するバンドを、行は信号値を増減させるバンドを示すことから、 n 列目に任意のスペクトルを配置することにより、強調するバンドに関わらず任意の色で可視化を行うことが可能となる。そのような行列 \mathbf{W} における q 列目の列ベクトル $[\mathbf{W}]_q$ を次のように定式化する、

$$[\mathbf{W}]_q = \begin{cases} k(\mathbf{g}_d - \mathbf{g}_a) & \text{if } q = n \\ \mathbf{0} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3.8)$$

ここで \mathbf{g}_d は表示したい色のスペクトル(N 次元ベクトル)であり、 \mathbf{g}_a は背景スペクトル、また k は強調の度合を調整するための定数である。原画像における信号値が非常に高い場合、それ以上信号値を増幅させても飽和してしまい十分に強調を行えない可能性がある。そこで背景スペクトルを減算することにより効果的な強調を実現する。残差ベクトル $\mathbf{r}_j = (\mathbf{g}_j - \mathbf{s}_j)$ の n バンド目の要素を r_{jn} としたとき、式(3.3)および式(3.8)より、強調後の画素ベクトルは、

$$\mathbf{g}_{e_j} = kr_{jn}(\mathbf{g}_d - \mathbf{g}_a) + \mathbf{g}_j \quad (3.9)$$

と表すことができる。ここであらかじめ強調対象となる画像中の色の分布が似ている場合、適切な定数 k を選択することにより、強調結果を \mathbf{g}_d へ近づけることが可能となる。今回は $\mathbf{g}_a = \bar{\mathbf{g}}$ として手法の適用を行っている。なお $\mathbf{g}_a = \mathbf{0}$ として \mathbf{g}_d が n バンド目のみ1となるベクトルを与えた場合、式(3.8)は式(3.4)と等しくなることから、提案する行列設計の変更は従来手法を含んだ行列の一般化としても扱うことができる。また以下では \mathbf{g}_d の決定方法について説明を行う。

手法 I. ユーザが任意の色を指定する手法

もっとも簡単な手法として、ユーザが用途に応じて画像やカラーパレットから任意の色を選択する手法が考えられる。カラーパレットを用いた場合、選択された色に対応した XYZ 三刺激値 (X_d, Y_d, Z_d) からスペクトル推定を行うことで、強調に使用するスペクトル \mathbf{g}_d を得る。この場合、三刺激値から分光反射率（透過率）を推定し、画像の入力システムのシステム関数に基づき信号値空間へと変換される。つまり、表示のためのスペクトル \mathbf{g}_d は、等色関数の一般疑似逆行列 \mathbf{C}^+ を用いて次式、

$$\mathbf{g}_d = \mathbf{HC}^+ \begin{pmatrix} X_d \\ Y_d \\ Z_d \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

のように推定される。ここで XYZ 三刺激値から推定された分光反射率（透過率）とその信号値の関係は式(3.5)を満たす。マルチスペクトル画像を色再現した RGB 画像を表示し、その画像から使用したい色を選択した場合には、指定したマルチスペクトル画像の原信号が \mathbf{g}_d として使用される。

手法 II. 画像中の平均色相から自動的に反対の色相を計算する手法

2 つ目の手法として、入力画像中の色が全体的に似ていることを想定し、視覚的に反対の色味を自動的に算出する手法を提案する。色相とは HSV, HLS や CIE $L^*a^*b^*$ 色空間などのような均一知覚色空間のパラメータであり、空間内において逆向きの色相は視覚的に反対の色味をもつとされる。この性質を利用することにより、画像中の平均色相を算出し反対の色相を求めることで、強調結果が視覚的に見やすいとされる色を自動で計算することが可能となる。まず入力画像全体から、平均の \bar{L}^* , \bar{a}^* および \bar{b}^* を算出する。そして負値をとることで反対の色相を得ることができるため、次式、

$$a_d^* = -\bar{a}^*, \quad b_d^* = -\bar{b}^* \quad (3.11)$$

と計算された a_d^* , b_d^* および \bar{L}^* から表示に用いるスペクトル \mathbf{g}_d を推定する。スペクトル推定はこれらを $L^*a^*b^*$ 色空間から XYZ 色空間へ変換したのち、式(3.10)に従って行われる。ただし輝度も知覚に大きく影響を与えるため、場合によっては \bar{L}^* を変更した方が強調結果がより明瞭になる可能性がある。

手法 III. 各バンドと表示に使用する色の対応関係を決定する手法

3 つ目の手法としてあらかじめ各強調バンドと表示色の対応関係を決定する手法を考える。例えば画像の 1 バンド目から n バンド目にかけて青から赤の色相を割り当てることで、短波長側を強調した場合には青、長波長側を強調した場合には赤で強調される、といったように従来手法と似たような強調結果を得ることができる。これらは色相などといった色データを利用した場合、必要に応じて式(3.10)によるスペクトル推定を行い、各バンドが強調されたときに使用するスペクトル \mathbf{g}_d として対応付ける。

3.3 実験

提案したマルチスペクトル色強調の実験を行い、手法の有効性を確認する。実験に使用した画像として、本論文の主テーマである病理画像、従来手法の適用が行われていた皮膚画像に加え、従来から一般的にマルチスペクトル画像が利用されているリモートセンシング画像を扱う。それぞれの画像の性質にあわせ、前節で提案した手法 I-III を適用していく。

3.3.1 病理画像応用

まず病理画像に対して色強調手法の適用を行う。撮影装置には図 2.6(a)に示した 16 バンドマルチスペクトル顕微鏡システムを使用した[33]。撮影システムの分光感度特性を図 3.2 に示す。今回実験に使用する標本として国立がんセンター製 H&E 染色肝臓標本を用いた (図 3.3)。なお画像サイズは 2048×2048 画素であり、対物レンズ 20 倍により撮影を行っている。

ここでは図 3.4 に示す線維領域の可視化を目的として色強調手法の適用を行う。H&E 染色標本において線維領域を可視化することができれば、強調結果を参照画像として用いることで低倍率の状態でも線維領域の位置を把握することが可能となるなど、診断支援としての活躍が期待される。文献[45]において線維領域の可視化を目的とした病理画像への色強調手法の適用が行われているが、パラメータの決定方法が煩雑であることが問題とされている。そこで前節で提案した色強調手法を用いて簡易なパラメータ設定を行い、線維領域の効果的な可視化を行う。

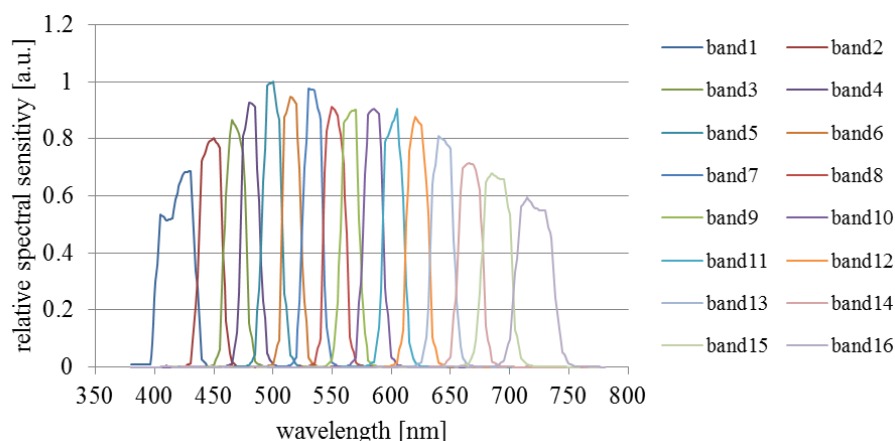


図 3.2 16 バンド顕微鏡システムの分光感度特性

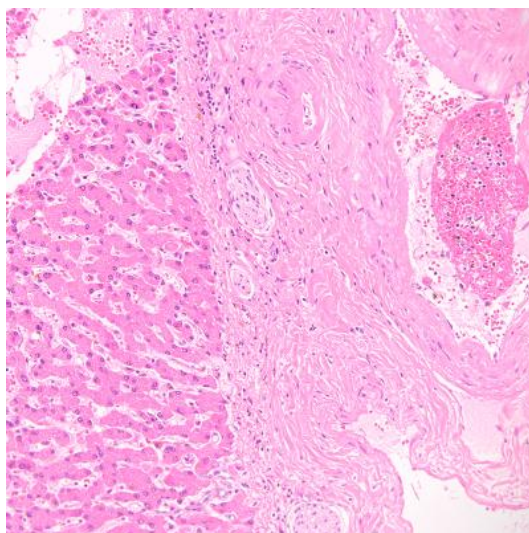


図 3.3 H&E 染色標本画像 (16 バンド撮影)

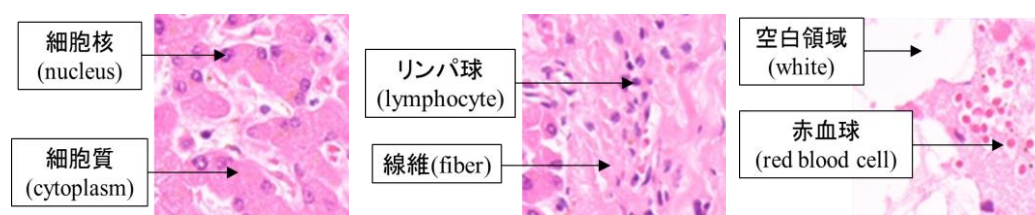


図 3.4 H&E 染色標本の各組織

線維領域の強調を目的としているため、線維以外の組織、すなわち細胞質、細胞核、赤血球およびガラスの各組織から 5×5 画素の ROI により 100 点ずつ画素信号値を取得し、計 400 点のデータから共分散行列を生成、KL 基底ベクトルを求めた。なお病理画像を扱う際、画像中の画素の位置により照明ムラなどが存在していることから、このようなムラの除去を行うために標本の信号値をガラス信号値で割った透過率を使用して計算を行う。このとき各波長（バンド）の透過率はガラスの透過率を 1 として次式で計算される。

$$t(\lambda) = \frac{i_{\text{tissue}}(\lambda) - d(\lambda)}{i_{\text{glass}}(\lambda) - d(\lambda)} \quad (3.12)$$

$i_{\text{tissue}}(\lambda)$ および $i_{\text{glass}}(\lambda)$ はそれぞれ同じ画素位置における、組織とガラスの波長 λ に対する信号値、また $d(\lambda)$ はカメラの暗電流信号値である。

基底の算出に使用した各組織、さらに線維領域の平均透過率を図 3.5 に示す。文献[45]では、上位基底のみによって線維を除く各組織が十分に表現可能である場合、8 バンド目（550nm 付近）において線維領域が特徴をもつことが報告されている。前述した KL 基底を第 6 基底まで使用したときの、図 3.5 に示した平均透過率に対する残差成分を図 3.6 に示す。グラフからもわかる通り、基底の作成に使用されていない線維領域は少ない基底で表

現することができないことから他の組織と比較しても残差が大きく、8 バンド目においてその特徴は顕著になっている。このときの固有値の累積寄与率は 0.9995 となる。

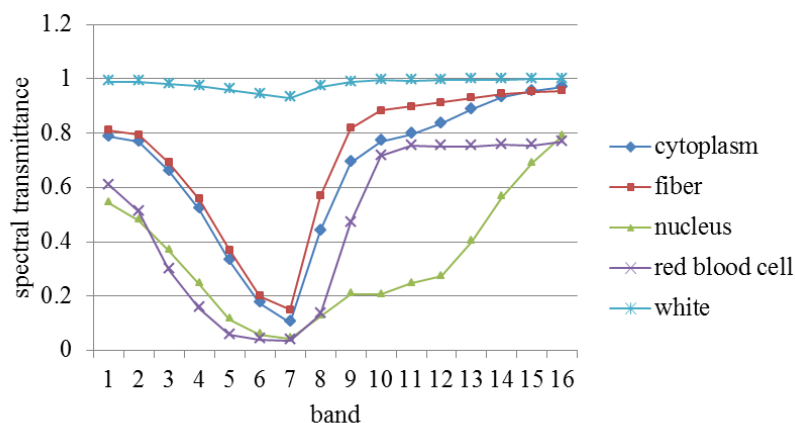


図 3.5 H&E 染色標本中における各組織の分光透過率

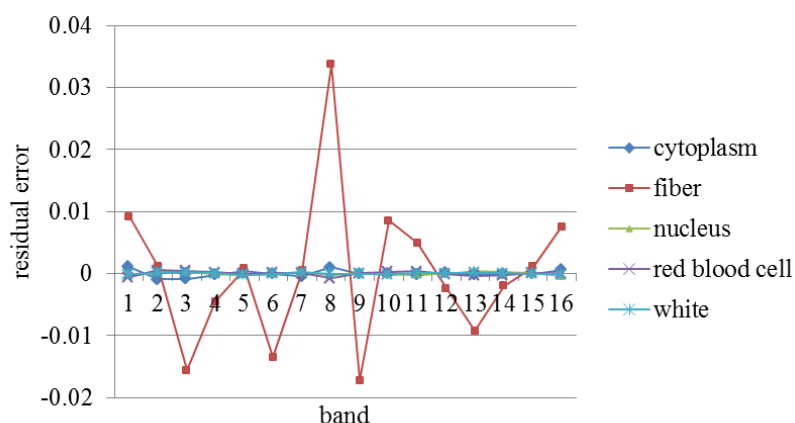


図 3.6 H&E 染色標本中における各組織の残差成分（第 6 基底まで使用）

この第 6 基底まで使用した際の 8 バンド目におけるスペクトル特徴を強調した場合、つまり $m=6$ かつ $n=8$ としたときの従来手法[41]による色強調結果を図 3.7 に示す。なおここでの重み係数の値は $k=30$ とした。結果の画像から、従来手法を適用した場合にはほぼ原画像と同じような強調結果が得られていることが確認できる。これは図 3.5 に示されているように、H&E 染色標本中における線維領域の 8 バンド目(550nm)およびその周辺波長帯域の透過率が比較的高いことが原因であり、8 バンド目の透過率が増幅されてもスペクトル形状の変化が少なく、結果として輝度がわずかに高くなり色味としてはほとんど変化が見られない。そこで先行研究では重み係数行列の他の箇所に負値の定数を配置することで線維領域の可視化を行っていたが、手動でそのようなパラメータを各バンドに対して設定

することは非常に煩雑な処理であり，実用を考えた場合に現実的でない．

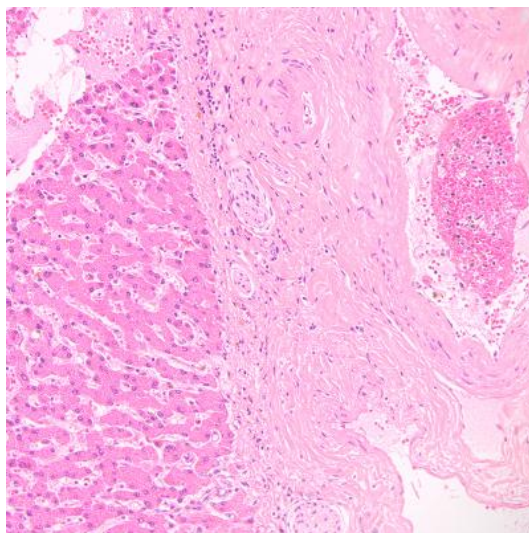


図 3.7 病理画像色強調結果（従来手法）

本論文では提案手法 I を用いることで，線維領域を観察するために使用される MT 染色標本中の線維領域の色で強調結果の可視化を行う．図 3.8 に示す MT 染色標本画像は図 3.3 の H&E 染色肝臓標本の連続切片であり，この画像から線維領域の透過率を 5×5 画素の ROI により 100 点取得し，平均したものを表示に使用するスペクトル \mathbf{g}_d とする．図 3.9 に MT 染色標本における線維領域の平均透過率を示す．よって図 3.9 に示すスペクトル \mathbf{g}_d と基底の算出に使用した平均透過率 \mathbf{g}_a を使用し重み係数行列を作成し色強調を行う．

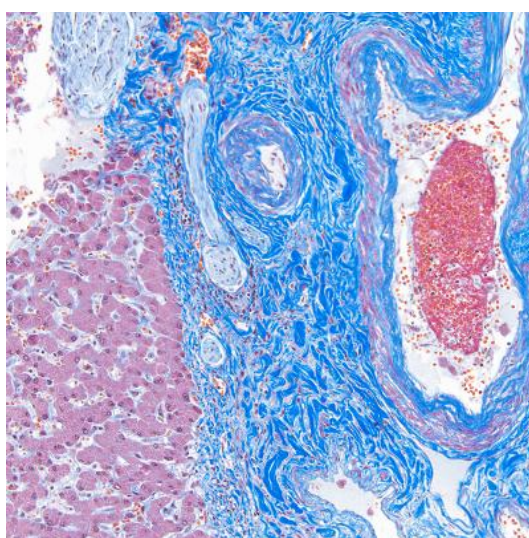


図 3.8 MT 染色標本画像（16 バンド撮影）

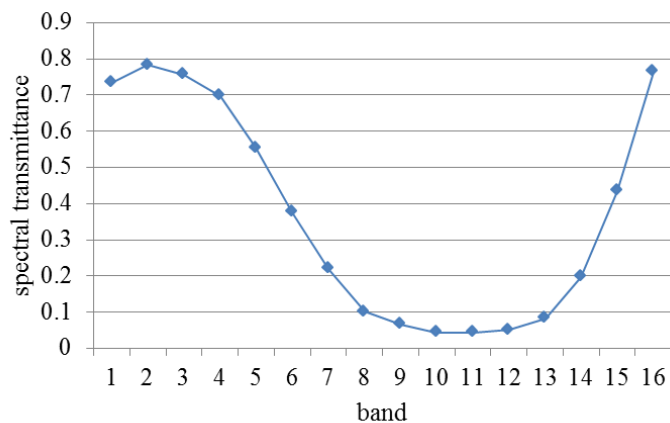


図 3.9 MT 染色標本中における線維領域の分光透過率

$m=6$ かつ $n=8$ としたときの提案手法による色強調結果を図 3.10 に示す．なお先ほどの処理と同様に重み係数の値は $k=30$ としている．結果より，H&E 染色標本中の線維領域が MT 染色の線維の色と似た色で可視化されていることが確認できる．このように従来手法ではうまく可視化できなかった強調結果に対しても，提案手法 I により効果的な可視化が実現できる．

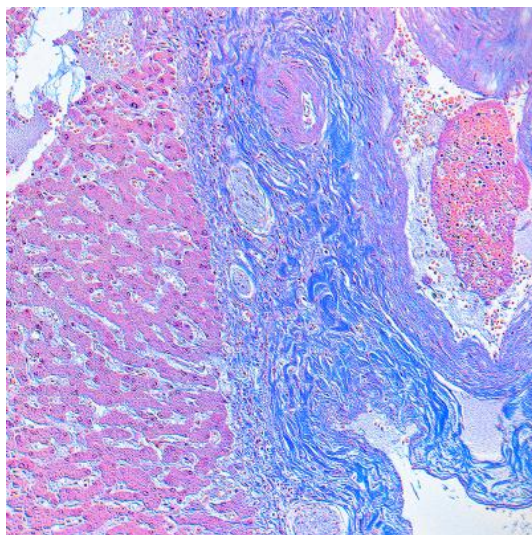
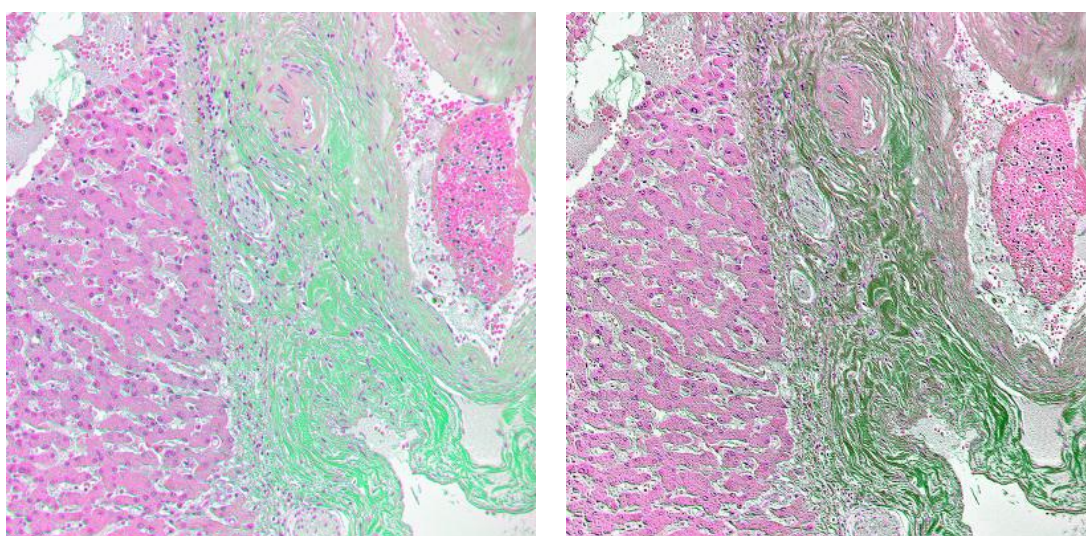


図 3.10 病理画像色強調結果（提案手法 I）

また今回実験に使用した病理画像はヘマトキシリンとエオジンの 2 つの色素により染められており，特にエオジンの色が画像中を占める割合が極めて多い．よって画像中の色の分布は似たような色味となっており，画像全体に対する反対の色味を算出することは比較的容易であると考えられる．そこで提案手法 II を図 3.3 の同標本画像に対して適用しその

有効性を確認する。上記の実験と同様の画像およびパラメータを用いて、手法Ⅱの適用を行った結果を図 3.11 に示す。なおこの手法では \mathbf{g}_d は画像全体の平均の色相から自動的に計算される。図 3.11(a) は輝度を変化させずに \mathbf{g}_d を計算したものであり、エオジンの色相と反対の色味をもつ色相で線維領域が可視化されていることが確認できる。しかしながら全体的に画像の輝度が高い場合、強調される領域の輝度を下げた方が強調結果が見やすくなる可能性が高い。そこで反対の色相から \mathbf{g}_d の推定を行う際に、輝度を原画像の平均輝度 $L_d^* = \bar{L}^*$ ではなく $L_d^* = 50$ の固定値としたときの結果を図 3.11(b) に示す。このように輝度を下げるなどの調整により周囲とのコントラストが高くなり、効果的な可視化を行える場合も存在する。



(a) 平均輝度を使用 ($L_d^* = \bar{L}^*$)

(b) 輝度を固定 ($L_d^* = 50$)

図 3.11 病理画像色強調結果 (提案手法Ⅱ)

また、以上の結果に対する定量的評価のために、細胞質と線維の間における平均色差の比較を行った。対象画像中の細胞質と線維からそれぞれ 5×5 画素の ROI により 100 点ずつ領域を選択し、各組織の平均透過率から平均 $L^*a^*b^*$ 値の算出、細胞質と線維における色差 ΔE の計算を行った。色情報 L_1^*, a_1^*, b_1^* と L_2^*, a_2^*, b_2^* との間における色差の計算式は以下の通りである。

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2} \quad (3.13)$$

色差の比較を表 3.1 に示す。表より、従来手法でもある程度色差が増えているものの、変化がほとんど輝度に影響を与えているため実際に画像で強調結果を確認することは難しい。しかしながら提案手法ではどの手法を用いた場合においても色差が極めて大きくなっており、効果的な可視化を行えていることが確認できる。なお提案手法Ⅱでは輝度を変化させ

ない場合の方が色差が大きくなっているが、50以上の色差になる場合には色差の大小と知覚に与える色の違いとの間の相関が低い可能性がある。

表 3.1 細胞質と線維の間における色差の比較

画像	ΔE
原画像	8.69
強調結果（従来手法）	19.3
強調結果（提案手法 I）	47.8
強調結果（提案手法 II，平均輝度を使用）	67.9
強調結果（提案手法 II，輝度を 50 に固定）	55.7

3.3.2 皮膚画像応用

従来手法[41]では手のひらを撮影した皮膚画像に対して色強調処理を適用し、病変部の強調や正常な皮膚における毛細血管や静脈の可視化を行っていた。そこで本論文における提案手法を皮膚画像に適用することで、従来手法では不明瞭となっていた色強調結果を効果的に可視化する。皮膚画像は図 3.12 に示す分光感度特性をもつ 16 バンドマルチスペクトル静止画カメラ[29]により撮影されたものであり、本実験で使用する皮膚画像を図 3.13 に示す。画像は 2048×2048 画素で撮影された原画像のうち、手のひらの領域を含む 1000×750 画素を切り出したものである。

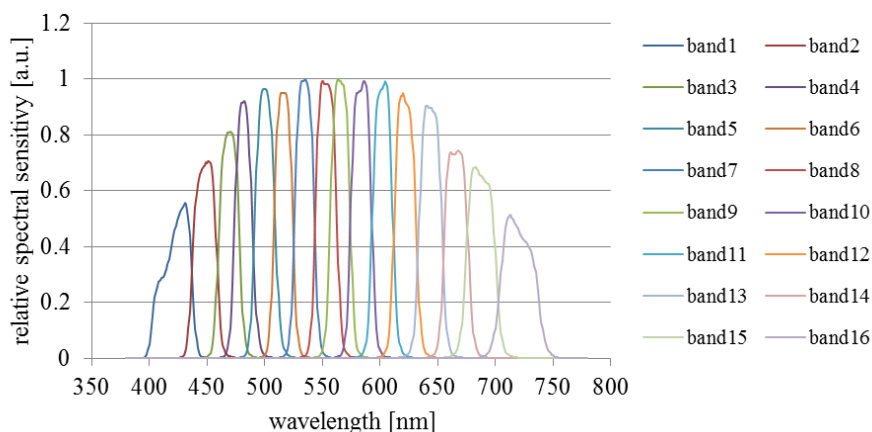


図 3.12 16 バンド静止画カメラの分光感度特性



図 3.13 皮膚画像 (16 バンド撮影)

画像全体の信号値から共分散行列を計算し、KL 基底の算出を行った。第 3 基底まで使用し $n=2,8,11,16$, $k=30$ としたときの従来手法による色強調結果を図 3.14 に示す。なお第 3 基底まで使用したとき、固有値の累積寄与率は 0.999 となる。図 3.14(a) は 445nm 付近の特徴を表しており皮膚表面のメラニンの分布が、また図 3.14(b) は 545nm 付近の特徴を示し表層近くの毛細血管の分布を強調している。さらに長波長側の波長帯域の光は深い部位まで到達するため、静脈などの領域においてヘモグロビンによる長波長光の吸収が多くなる。よって 600nm を強調した場合には図 3.14(c) に示すように長波長帯域のスペクトル特徴として静脈領域が強調される。しかしながらより長い波長帯域である 710nm を強調した場合には図 3.14(d) にもあるように原画像とほぼ等しい強調結果が得られ、スペクトル特徴を確認することができない。これはマルチスペクトル画像から RGB 画像へ変換する際の色再現に使用する等色関数が 700nm 以降にほぼ感度を持っていないことが原因となっている。このことから不可視帯域付近にスペクトル特徴をもっている場合、従来手法では効果的な可視化を行えないことがわかる。実際には、図 3.15 に示すように第 3 基底まで使用した場合、16 バンド目の残差成分が静脈領域に特徴をもっている (画像は残差成分のうち最小値を 0, 最大値を 255 に割り当てたグレースケール画像)。今回の実験では 16 バンド目に特有な新たなスペクトル特徴を見つけることはできていないが、実際に他の画像の色強調を行ったときに赤外付近などの波長帯域に重要なスペクトル特徴が存在していた場合、うまく可視化を行えないことからその特徴を見落とす可能性がある。しかしながら提案手法を用いることでこのような問題を改善し効果的な可視化が可能になると考えられるため、実験によりその有効性を確認する。

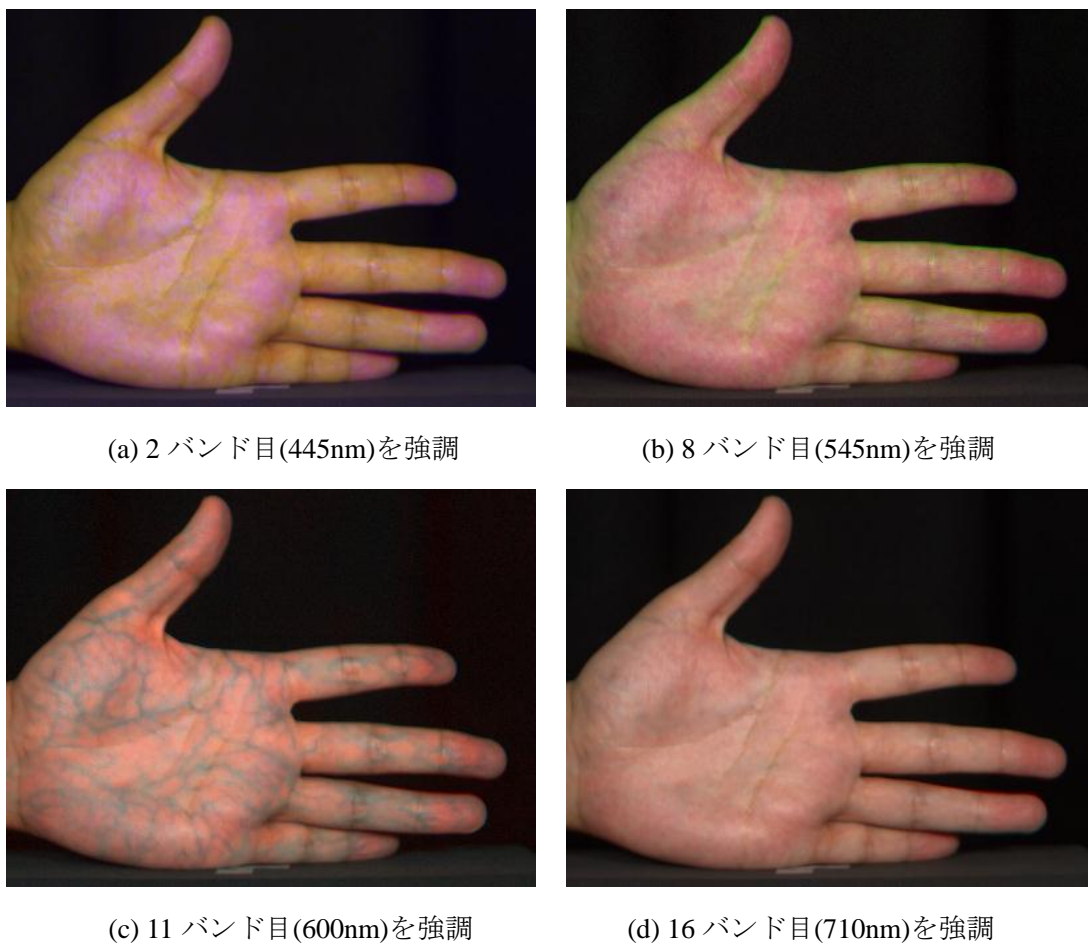


図 3.14 皮膚画像色強調結果 (従来手法)

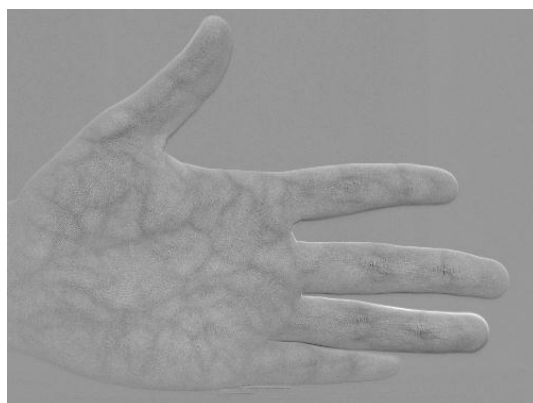


図 3.15 16 バンド目における残差成分 (第 3 基底まで使用)

皮膚画像の色強調では提案手法 III を利用し, 従来手法と同様に短波長側を強調した際に青, 長波長側を強調した際に赤で強調箇所が可視化されるような汎用的な処理を適用する. 均等知覚色空間である L^*C^*h 色空間の色相 h を等間隔で回転させながら各波長帯域に割り

当てることで色相のマッピングを行う。色相マッピングの流れを図 3.16 に示す。今回は 16 バンド画像を対象として処理を行うため、開始の色相を $h_{\text{start}} = 240^\circ$ (青色) とし、終点の色相 $h_{\text{end}} = 0^\circ$ (赤色) に向けて $\Delta h = -16^\circ$ ずつ回転させる。それぞれの色相は次式,

$$a_h^* = C^* \cos h, \quad b_h^* = C^* \sin h \quad (3.14)$$

により $L^*a^*b^*$ 色空間, さらに XYZ 色空間へと変換され, 式(3.10)のスペクトル推定により表示に使用するスペクトル \mathbf{g}_d の算出を行う。つまり $h = 240^\circ, 224^\circ, 208^\circ, \dots, 0^\circ$ の各色相から推定されたスペクトル \mathbf{g}_d が 1,2,3, ..., 16 バンド目にそれぞれ割り当てられ, 前述の実験で強調したバンド $n = 2, 8, 11, 16$ に対してはそれぞれ色相 $h = 224^\circ, 128^\circ, 80^\circ, 0^\circ$ に対応したスペクトルが使用される。なおスペクトル推定に必要な輝度 L^* および彩度 C^* はあらかじめ設定する必要があり, 今回の実験ではそれぞれ $L^* = 50$, $C^* = 80$ とした。また背景のスペクトル \mathbf{g}_a には画像全体の平均ベクトルを用いている。

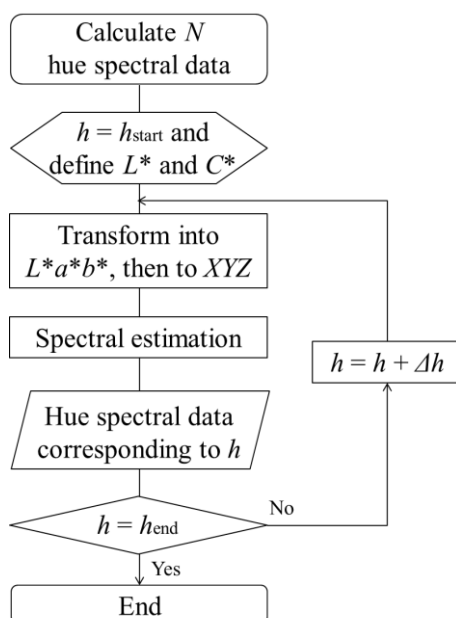


図 3.16 色相マッピングの流れ

図 3.13 に示す原画像に対して上記の手法を適用した結果を図 3.17 に示す。図 3.17(a), (b) および(c)では従来手法と同様に, 各領域のスペクトル特徴が可視化されていることを確認できる。さらに図 3.17(d)では, 従来手法では可視化できていなかった静脈領域が緑色に強調されていることが見て取れる。このようにスペクトル特徴が不可視帯域に近い場合でも, 可視化の際に使用する色を可視域に落とし込むことで効果的な強調を行うことが可能となる。

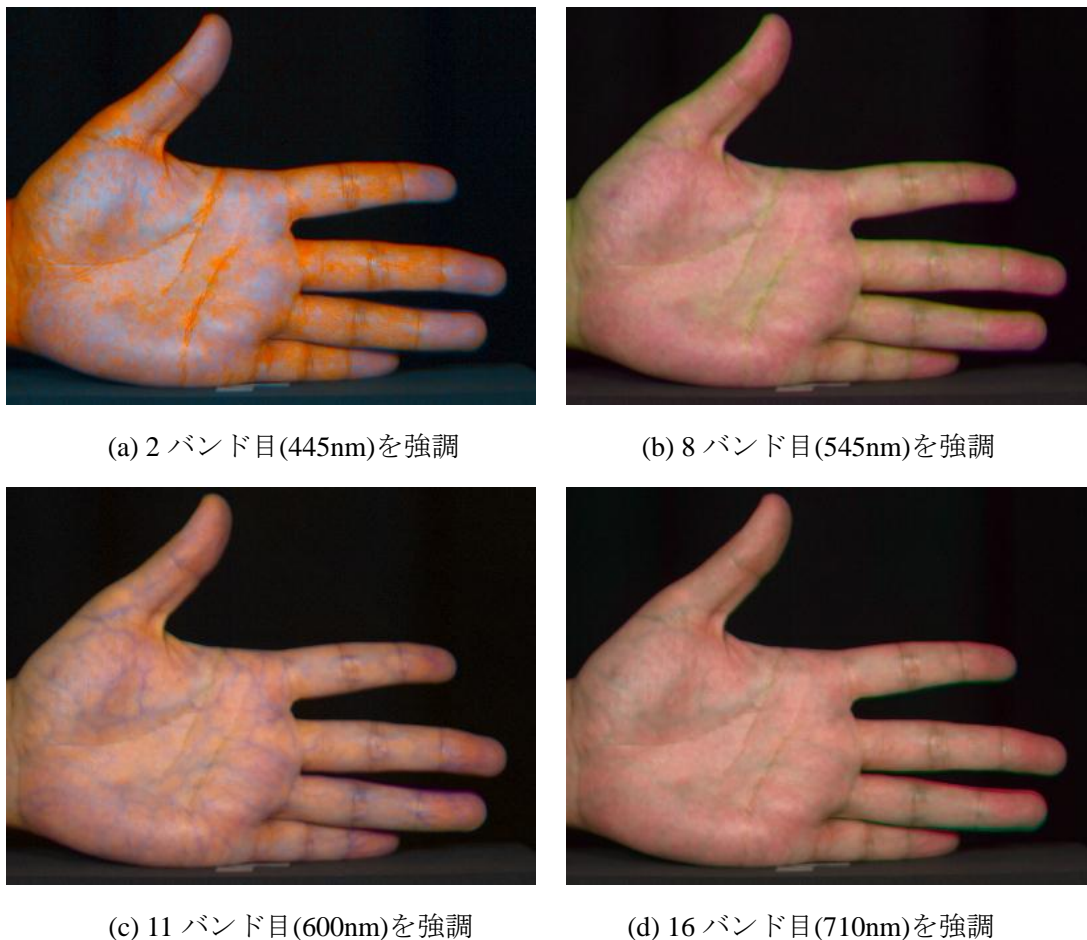


図 3.17 皮膚画像色強調結果（提案手法 III）

また定量的評価として、正常な皮膚領域と静脈領域における色差の比較を行った。各領域から 2×2 画素の ROI を 50 点選択し、その平均 $L^*a^*b^*$ 値を算出し色差の比較を行った比較結果を表 3.2 に示す。従来手法では色強調を適用しても色差がほとんど変化しておらず、画像として視覚的に強調結果を確認できないことがわかる。提案手法を用いた場合には従来手法と比較して色差が大きくなっており、原画像や従来手法結果では輝度の差が色差に占める割合が多かったが、提案手法では Δa^* が特に大きくなっていることから色味としての色差が大きくなっている。皮膚画像への色強調処理適用により、強調する波長帯域が不可視帯域に近い場合でも十分に効果的な可視化を行えることを確認した。

表 3.2 皮膚領域と静脈領域の間における色差の比較

画像	ΔE	ΔL^*	Δa^*	Δb^*
原画像	10.6	9.91	2.80	2.56
強調結果（従来手法）	10.4	9.64	2.87	2.73
強調結果（提案手法 III）	12.9	10.4	7.51	1.88

3.3.3 リモートセンシング画像応用

3.3.1 および 3.3.2 では病理画像，皮膚画像といった医用分野の画像へ色強調手法を適用しその有効性を確認した．ここでは画像解析手法として一般的な有効性を確認するために，リモートセンシング分野への応用について検討する．リモートセンシング分野では従来よりマルチスペクトルおよびハイパースペクトル画像が広く使用されており，様々な画像解析技術が提案されている[20-22]．したがってリモートセンシング画像を用いて色強調手法の効果を確認することができれば，一般的なマルチスペクトル画像に対して有効性を示す上で非常に有用となる．リモートセンシング分野においてよく使用されるハイパースペクトル画像は 5nm 以下の波長分解能をもっていることが多く，従来手法による色強調では可視光域に極端に多くのチャンネルをもつ画像の強調は困難であった．しかしながら提案手法では単一の波長を強調した場合でもベクトルとしての加減を行うため効果的な可視化が可能になると考えられる．ここでは農業応用と林業応用を対象として植生画像を扱う．

圃場画像に対する色強調処理

まず実験の対象画像として図 3.18 に示す圃場画像を使用する．この画像は出穂前である 8 月に水田を撮影したものであり，図 3.19 のハイパースペクトル撮影装置により取得されたものである．装置は図 2.3(d)と同様のハイパースペクトルセンサ ImSpector V10(Specim 社)をクレーンに取り付けたものであり，クレーンの操作とカメラのスキャンを同期させることにより画像の撮影を行う[47]．一度に取得される箇所は図 3.18 中の垂直方向 1 列の画素となっており，画像水平方向に対してスキャンを行っている．ハイパースペクトル画像は 400-1000nm を波長方向に 5nm 間隔でサンプリングしており，波長分解能は 3nm となっている．しかし 900nm 以降の波長帯域についてはノイズが多く含まれているため，本論文の中では使用していない．したがって実験で使用されるハイパースペクトル画像は 400-900nm を 5nm 間隔でサンプリングした 101 バンド画像となる．画像のサイズは 2000×400 画素であり，各画素の信号値は画像中の標準白色版の信号値で割ることにより分光反射率へと変換される．なおハイパースペクトル画像を用いた実験では波長サンプリング数が十分に多いため，分光反射率の推定を行うことなく同じ間隔で波長方向にサンプリングされた等色関数および照明光を使用して色再現を行う．



図 3.18 圃場画像 (8 月撮影)



図 3.19 屋外ハイパースペクトル画像撮影システム

植生画像の画像解析には様々な植生指標が提案されており、複数の指定した波長帯域の分光反射率の比などを用いて算出されるものが主である[48,49]. 色強調手法を適用することにより明らかになるスペクトル特徴を指標の算出に用いることで、新たな植生指標へ応用できる可能性がある. そこで本実験では稲と雑草, または稲間におけるスペクトル特徴の観察を目的とする. ここでは提案手法 I を使用し, 植生画像は画像の大半を緑色の成分が占めるため, 表示に使用するスペクトル g_d としてマクベスカラーチェッカー (図 3.20) 中のマゼンタを使用することで明瞭な強調結果を得る. マクベスカラーチェッカー画像は図 3.21 に示す室内用のハイパースペクトル撮影システムにより撮影されたものであり, ハイパースペクトルセンサは前述したものと同様のものを用いている. 画像中のマゼンタ領域から 5×5 画素の ROI を 50 点選択したときの平均分光反射率を g_d とする.

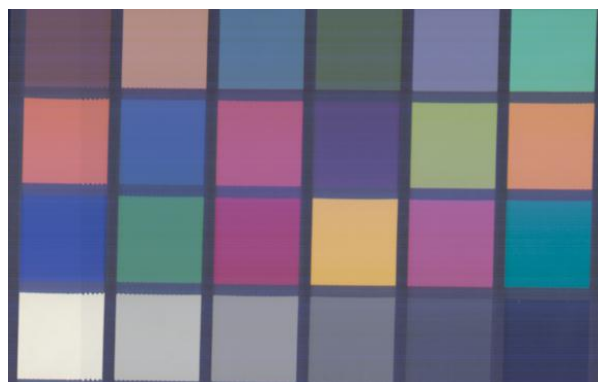


図 3.20 マクベスカラーチェッカー



図 3.21 室内ハイパースペクトル撮影システム

今回は稲の存在している領域に注目するため、周囲の雑草領域（図 3.22）から基底の算出を行った。稲や雑草といった領域は色が似ており、基底を多く使用すると残差成分中の特徴が失われる可能性があるため、今回は第 1 基底のみを使用し重み係数 $k=20$ として色強調を行った。500-900nm の波長範囲を 50nm ごとに使用し、すべての強調結果の観察を行う。 $m=1$ および $n=21, 31, 41, \dots, 101$ としたときの強調結果を図 3.23 に示す。なお今回は比較手法としての従来手法適用を省略するが、従来手法を適用した場合には前述したとおり 1 波長あたりの分光反射率の変化が RGB 画像に与える影響が非常に小さいため、強調された領域の色が大きく変化しないことが予測できる。



図 3.22 圃場画像内の各領域



(a) 500nm を強調



(b) 550nm を強調



(c) 600nm を強調



(d) 650nm を強調



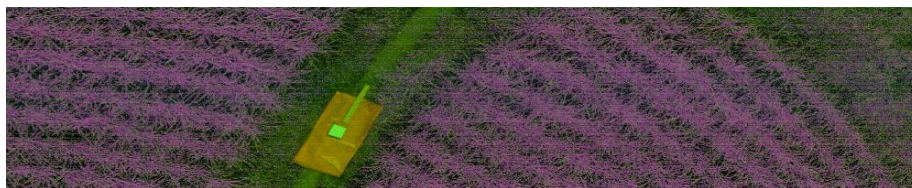
(e) 700nm を強調



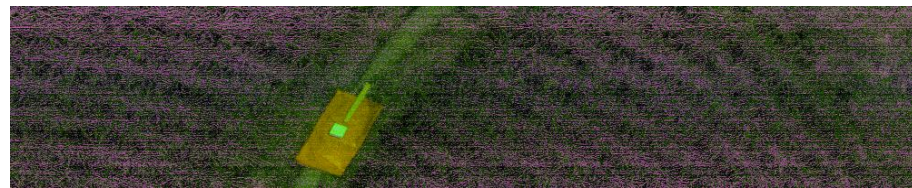
(f) 750nm を強調



(g) 800nm を強調



(h) 850nm を強調



(i) 900nm を強調

図 3.23 圃場画像色強調結果 (提案手法 I)

図 3.23(b)より、稲の一部がマゼンタに強調されていることを確認した。また今回は基底を1つしか使用していないことと、雑草領域におけるスペクトルのばらつきが多いことから、基底の生成に使用した雑草領域も強調されている。図 3.23(b)から雑草領域、強調された稲および強調されていない稲のそれぞれ領域の画素を 3×3 画素の ROI により 100 点ずつ指定し、平均の分光反射率を取得、第 1 基底まで基底を使用した際の残差成分の算出を行った (図 3.24)。図中の“crop”は図 3.23(b)の強調結果において強調されなかった稲、また“crop_en”は同図中においてマゼンタに強調された稲の領域である。図 3.24 に示すように、土壌領域は 700nm 付近に、稲領域は 800nm 付近に大きな残差を有していることが確認でき、稲領域の特徴はバイオマス含有[50]によるものであると考えられる。これらの特徴はそれぞれ図 3.23(e)および(g)からも視覚的に確認することができる。また図 3.24 より 725nm において稲と土壌の間における残差成分の差異が大きくなっていることから、725nm を強調した場合によりこれらの領域の間のコントラストが高くなり、強調結果が見やすくなると思われる。図 3.25 に 700nm および 725nm を強調した結果の拡大図を示す。また原画像中の各領域における分光反射率を図 3.26 に示す。稲や雑草では 680-750nm にかけてレッドエッジと呼ばれる大きなスペクトルの変化があるが、これらは物体中のクロロフィルにより生じるスペクトルの特徴であるため、土壌領域には存在しない。このような理由から土壌領域では 700nm 付近に残差成分としてスペクトル特徴が表れている。また稲領域におけるスペクトル特徴は近赤外波長におけるスペクトル形状の違いによるものだと考えられる。このようにして観察されたスペクトル特徴は領域識別などに応用することが可能であると考えられ、また同じ稲領域の中でも生育状況によって異なる残差成分が得られれば新たな植生指標への応用などが考えられる。次の実験では異なる時期に撮影された複数の画像を用いて色強調手法の適用を行う。

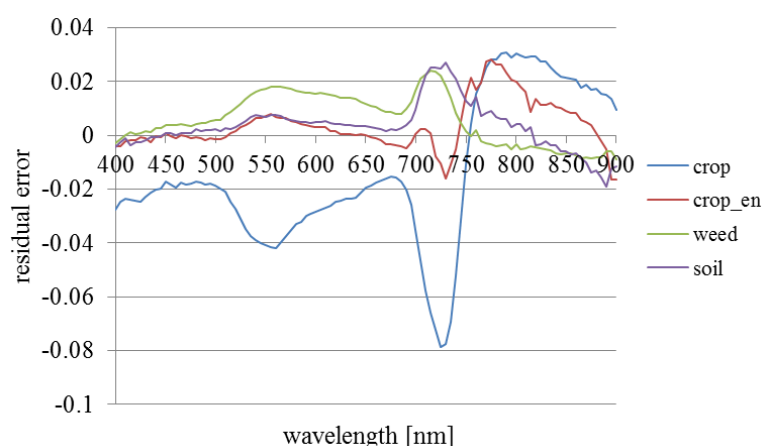


図 3.24 圃場画像における各領域の残差成分

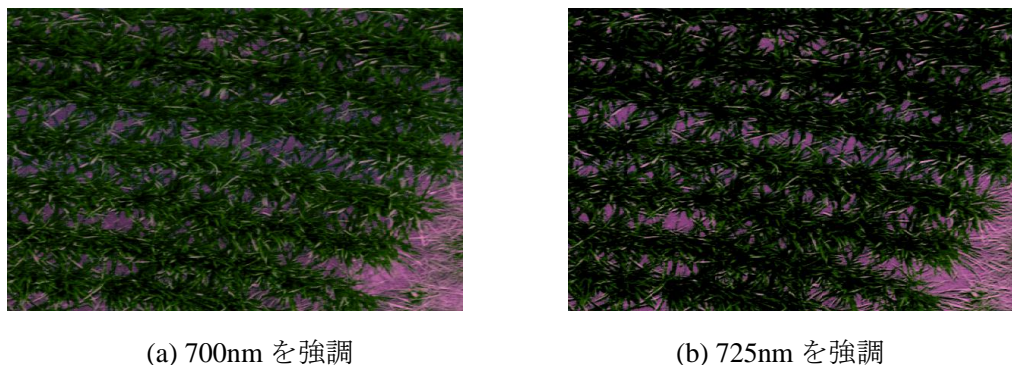


図 3.25 圃場画像色強調結果 (部分拡大)

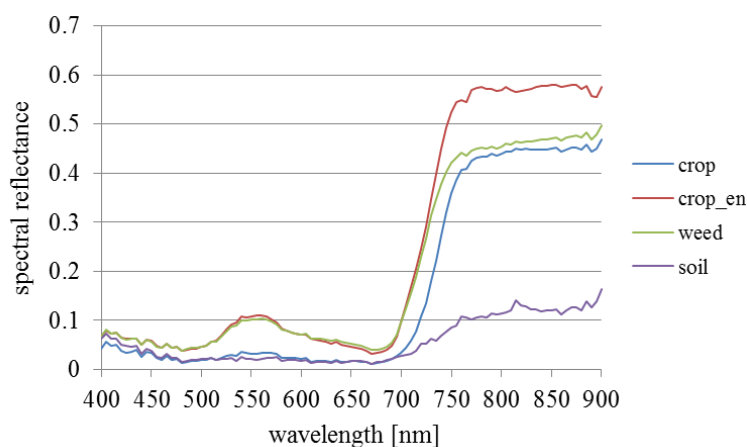


図 3.26 圃場画像における各領域の分光反射率

前述した実験と同じ撮影システムにより取得されたハイパースペクトル画像を図3.27に示す。図3.27(a)および図3.27(b)はそれぞれ2007年8月および同年9月に撮影されたものであり、8月の段階では稲の領域は出穂前、9月にはすでに収穫後の画像となっている。各画像サイズは 1000×400 であり、8月撮影の画像は図3.18から領域切り出しを行ったものと等しい。前実験では稲と雑草の間といったような異なる種におけるスペクトル特徴の観察を行ったが、今回は稲の中における生育状況などの違いによるスペクトル特徴の観察を目的とする。そのため周囲にあった雑草領域は切り取られ、また750-900nmの平均分光反射率が0.3以下であった画素は土壌と見なし全ての計算で無視した。本実験では8月撮影画像の左端 200×400 画素からKL基底ベクトルの算出を行い、前実験により1つのKL基底のみでは基底算出に用いたスペクトルの表現が不十分であることがわかっていることから、今回は第3基底までのKL基底ベクトルを使用して色強調処理の適用を行っている。



(a) 8月撮影画像



(b) 9月撮影画像

図 3.27 圃場画像（異なる時期に撮影）

以上の条件により, 400-900nm の波長範囲を 10nm おきに強調波長 n として指定し $m=3$, $k=10$ としたときの各波長における色強調結果の観察を行った. 図 3.28 に示す 650nm を強調したときの結果より, 8 月撮影の画像では同画像から算出した基底によりスペクトルが十分に表現できておりあまり色の変化が見られないが, 9 月撮影の画像では稲の領域がマゼンタで強調されていることが確認できる. また 9 月撮影の稲領域の中にも強調されておらず緑色に保たれている画素が存在していることが図 3.29 よりわかる.



(a) 8月撮影画像



(b) 9月撮影画像

図 3.28 圃場画像色強調結果（650nm を強調）



図 3.29 圃場画像色強調結果（650nm を強調，部分拡大）

これらの領域がどのような分光反射率をもっているか調べるために，8 月撮影画像中の稲領域，9 月撮影画像中の強調されなかった稲領域および強調された稲領域から，それぞれ 3×3 画素の ROI50 点により平均分光反射率の算出を行った．図 3.30 は各領域の平均分光反射率の比較のグラフであり，前述した各領域をそれぞれ“crop_Aug”，“crop_Sept”，“crop_Sept_en”として記載している．8 月撮影の段階では出穂前のものであるため，稲の分光反射率のクラスは 1 つになることが考えられ，“crop_Sept”は“crop_Aug”と近いスペクトルを示していることからこれらはともに葉を示すものと考えられる．また 9 月撮影が出穂後のものであることから，大きくスペクトル形状が変化している“crop_Sept_en”は稲穂に相当することが考えられる．図 3.27(b)に示した原画像中では稲穂と葉の領域の目視による区別は困難であったが，色強調を行うことで稲穂が強調され視認を容易にした．前実験で得られた図 3.26 の分光反射率と比較すると，図 3.26 中の“crop_en”および“crop”の関係は図 3.30 の“crop_Sept_en”と“crop_Sept”，すなわち稲穂と葉の関係と類似していることがわかる．そのためこれらの領域が正確に一致していれば，出穂前の段階においても稲穂と葉を区別できていることになる．また今回の実験結果では稲穂と葉の間におけるスペクトルの差異がさらに大きくなっていることから，生育状況によっても強調結果は変化することが予測され，このような生育状況を可視化できるスペクトル特徴を観察できることは，新たな植生指標への応用などにもつながると考えられる．平均分光反射率から KL 基底を 3 つ用いて算出した残差成分を図 3.31 に示す．図より 600-700nm において稲穂の領域が葉と比べて大きな残差をもっていることが確認できる．さらに稲穂の育成状況により残差の振幅が変化することが予測され，色強調により観察された波長帯域のスペクトル特徴を利用することで新たな植生指標の提案を行える可能性がある．

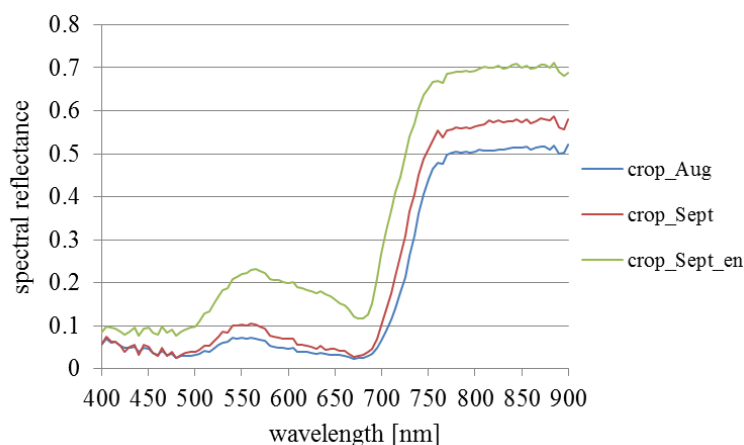


図 3.30 異なる時期に撮影された圃場画像における各領域の分光反射率

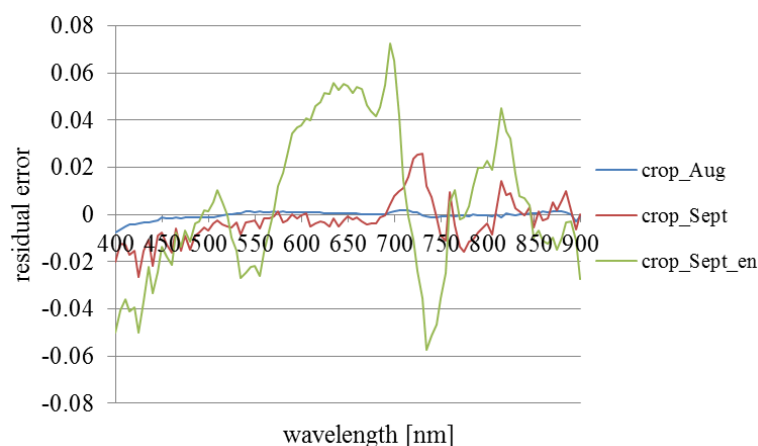
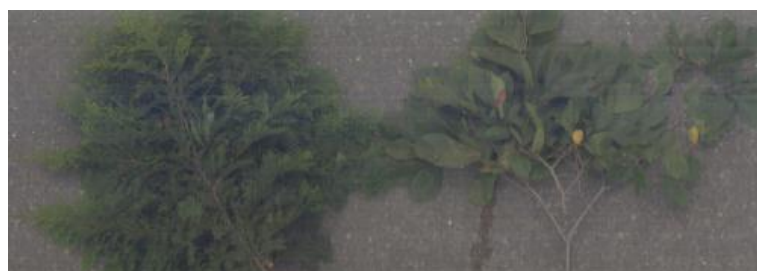


図 3.31 異なる時期に撮影された圃場画像における各領域の残差成分

樹木画像に対する色強調処理

次に樹木の画像に対して色強調手法を適用しその有効性を確認する。例えばミズナラはブナ林などに交じって広葉樹林の重要な構成樹種となり、ナラ枯れ被害[51]などの観点からも、ミズナラとブナを判別できることは非常に価値があると言える。よって樹木の種類の分類を行えることはリモートセンシング分野において重要であり、現在でも樹種分類に関する様々な研究が行われている[52-54]。ここでは樹種分類への応用を目的として色強調手法の適用を行い、異なる樹種間の区別を可能とするようなスペクトル特徴の観察を行う。

実験に使用するハイパースペクトル画像を図 3.32 に示す。これらは樹木から枝葉を切り落としたものを、前述した圃場画像を撮影したものと同様のハイパースペクトル撮影システムにより撮影したものである。図 3.32(a)の画像サイズは 1000×350 画素、また図 3.32(b)の画像サイズは 900×300 画素となっている。撮影された樹種はそれぞれ図 3.32(a)の左からヒノキ、ハルニレ、図 3.32(b)の左からミズナラ、ブナである。



(a) 画像左からヒノキ, ハルニレ



(b) 画像左からミズナラ, ブナ

図 3.32 樹木画像

今回はミズナラとブナの樹種分類を行えるようなスペクトル特徴を観察することを目的とするためテスト画像として図 3.32(b)を使用するが, 図 3.32(a)を一般的な樹種の例として基底に用いることにより色強調技術としての汎用性を高めることを狙いとする. 基底の算出には図 3.32(a)の画像全体の分光反射率を使用し, 前実験と同様に 750-900nm の平均分光反射率が 0.3 以下であった画素は地面と見なし基底の算出をはじめとする強調処理の全ての計算過程で無視している. 強調結果の表示に使用するスペクトル g_d は圃場画像を用いた実験と同様にマクベスカラーチェッカー中のマゼンタのスペクトルを利用し, 背景スペクトル g_a には基底算出の際のデータの平均分光反射率を使用している. 以上の条件により, KL 基底を第 3 基底まで使用, すなわち $m=3$, また重み係数を $k=30$ とし, 強調波長を 5nm ずつ変化させ図 3.32(b)に対して処理を行い, 全波長における強調結果の観察を行った. 695nm を強調したときの結果を図 3.33 に示す.



図 3.33 樹木画像色強調結果 (695nm を強調)

結果より、ブナの葉の一部の領域がマゼンタで強調されていることを確認した。そこでミズナラ、強調されなかったブナ（図 3.33 中緑で表示）、強調されたブナ（図 3.33 中マゼンタで表示）からそれぞれ 3×3 画素の ROI により 50 点を選択し、分光反射率の取得を行った。各領域を“oak”, “beech”, “beech_en”としたときの平均分光反射率の比較を図 3.34 に示す。この図より、“beech_en”においてレッドエッジが短波長側に移動するブルーシフトが見られ、ブナの葉の中で強調された領域は葉裏であるか水ストレスを受けている可能性が高い。結果から色強調手法により葉のコンディションを可視化することができ、ここから見つけ出されるスペクトル特徴は病気の早期発見などに有用となる可能性がある。さらに KL 基底を 3 つ使用した際の各領域における残差成分（図 3.35）からもわかるように、705nm においてブナが葉のコンディションに関わらず大きな残差をもつ。これらの特徴は図 3.36 のように強調結果として確認することができ、このようなコンディションに依らないスペクトル特徴は樹種分類に応用できる可能性がある。

以上のようにマルチスペクトル画像色強調は画像中のスペクトル特徴の観察を容易にし、本手法により確認された特徴はさらに他の画像解析への応用が期待される。色強調手法の応用としても正常な植生スペクトルから作成した基底を使用することで、異常なスペクトル分布をもつ領域を可視化できるため、圃場画像ではいもち病をはじめとする病気、また樹木画像に関しても様々な樹病を検出できる可能性がある。

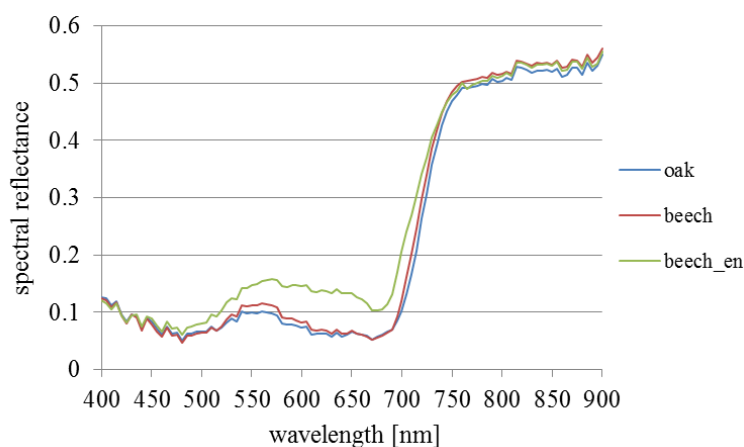


図 3.34 樹木画像における各領域の分光反射率

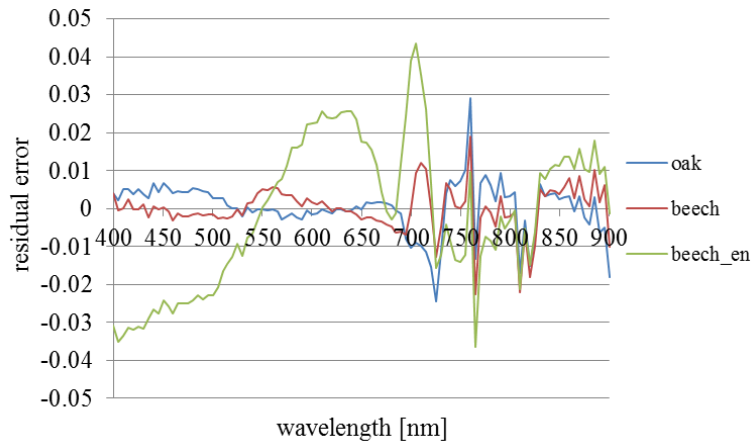


図 3.35 樹木画像における各領域の残差成分



図 3.36 樹木画像色強調結果（705nm を強調）

3.4 色強調手法の高速化と GUI 実装

前節までに、複数の画像に対して色強調手法を適用し、その有効性を確認した。しかしながらマルチスペクトル WSI システムが実現した際に、ビューアシステムへ実装することを考慮すると計算時間が問題となる。ここでは色強調アルゴリズムの高速化に関して検討を行い、さらに実用を想定した GUI を実装することによりその効果を確認する。

式(3.1)と式(3.2)より、 m 本の基底を用いて復元された画素 j におけるマルチバンド画素信号値 \mathbf{s}_j は、KL 展開係数の順序を入れ替えることにより、

$$\mathbf{s}_j = \sum_{i=1}^m \mathbf{u}_i \mathbf{u}_i^T (\mathbf{g}_j - \bar{\mathbf{g}}) + \bar{\mathbf{g}} \quad (3.15)$$

と書くことができる。ここで数列和 Σ によって表される部分は、KL 基底ベクトルを列ベクトルにもつ正則行列の乗算を用いて表すことができ、行列の q 列目における各列ベクトルは、

$$[\mathbf{U}]_q = \begin{cases} \mathbf{u}_q & \text{if } q \leq m \\ \mathbf{0} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (3.16)$$

となる。式(3.16)のように定義された行列 \mathbf{U} を用いて、式(3.15)は、

$$\mathbf{s}_j = \mathbf{U}\mathbf{U}^T(\mathbf{g}_j - \bar{\mathbf{g}}) + \bar{\mathbf{g}} \quad (3.17)$$

と表すことができ、これを式(3.3)に代入し \mathbf{g}_j と $\bar{\mathbf{g}}$ についてそれぞれまとめることにより、強調結果の画素信号値、

$$\mathbf{g}_{e_j} = [\mathbf{W}(\mathbf{E} - \mathbf{U}\mathbf{U}^T) + \mathbf{E}]\mathbf{g}_j - \mathbf{W}(\mathbf{E} - \mathbf{U}\mathbf{U}^T)\bar{\mathbf{g}} \quad (3.18)$$

を得ることができる。ここで \mathbf{E} は単位行列を示す。 $\bar{\mathbf{g}}$ を含む項および \mathbf{g}_j の係数項は定数ベクトル、定数行列となるため、KL基底ベクトルを算出した後に使用する基底の本数および重み係数行列を決定しこれらの項を計算することにより、画像全体に対して乗算と加算をそれぞれ1回ずつ行うことにより色強調を可能とする。特に $\mathbf{E} - \mathbf{U}\mathbf{U}^T$ は重み係数行列 \mathbf{W} の影響を受けないため、使用する基底の数を変更しない場合、パラメータの変化に対して高速な色強調処理が可能となる。実際には色再現のための $3 \times N$ 行列も各項にあらかじめ乗算することが可能である。

上記の高速化手法による効果を確認するため、式(3.3)に基づいた通常の計算を行った場合と高速化手法との処理時間の比較を行った。計測には3.3.1節で述べた提案手法Iの処理と同じものを実行し、対象画像は実験に使用した画像から 512×512 画素で切り出したものを利用する。使用するKL基底を1から16まで順に増やしていき、すべての処理において $k=10$ として色強調処理を行った。各使用基底数の実験において、重み係数行列の計算からRGB画像の生成までを1回の処理として計算に要した時間を計測し、同処理を10回繰り返すことにより平均の処理時間を算出した。なお実行したコンピュータのCPUはIntel Core 2 Duo 6400(2.13GHz)、実装メモリは8GBとしている。処理時間の比較を表3.3に示す。

表 3.3 処理時間の比較(単位は sec.)

基底数	従来 アルゴリズム	高速化 アルゴリズム	基底数	従来 アルゴリズム	高速化 アルゴリズム
1	22.7	0.604	9	41.2	0.607
2	25.4	0.605	10	43.4	0.597
3	27.5	0.613	11	45.6	0.605
4	29.7	0.608	12	47.8	0.619
5	31.9	0.611	13	50.0	0.628
6	34.1	0.599	14	51.6	0.620
7	36.2	0.617	15	54.1	0.609
8	39.0	0.612	16	56.2	0.614

表より、高速化アルゴリズムにより通常の計算方法に比べて大幅な計算時間の削減を行っていることが確認できる。特に従来アルゴリズムを使用した通常の計算方法では、基底

を増やすにつれ処理時間が増加することが問題となるが、高速化アルゴリズムを実装することにより使用する基底の数に依らず一定の処理時間で色強調手法が実行可能となる。

実システムへの実装を想定し、前述した高速化アルゴリズムを用いたGUIアプリケーションを実装した。開発環境としてはVisual Studio 2008を使用し、使用言語をC++としてダイアログベースMFC(Microsoft Foundation Class)により作製を行った。今回実装した機能としては提案手法Iおよび重み係数行列として対角成分のみを用いた従来手法による色強調機能であり、KL基底ベクトルは画像全体から算出するか、外部で計算を行いテキストファイルとして読み込むかをユーザ側で指定する。GUIアプリケーションの実行画面を図3.37に示す。図中の各機能は表3.4の通りである。

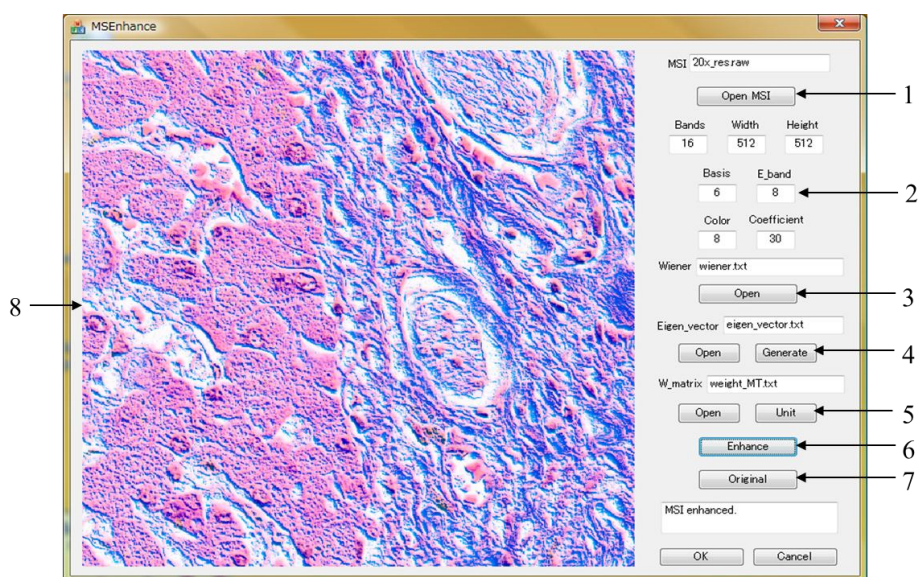


図 3.37 GUI 実行画面

表 3.4 実装した機能

番号	機能
1	マルチスペクトル画像読み込み
2	各パラメータ入力—バンド数 N ，画像幅，画像高さ，基底数 m ，強調バンド n ，強調表示色（テキストファイル中の列を指定），重み係数 k
3	色再現マトリクス読み込み
4	KL 基底ベクトル読み込み（テキストファイル）／ 画像全体から KL 基底ベクトル計算
5	表示色スペクトル読み込み（テキストファイル）／対角行列を使用（従来手法）
6	色強調実行
7	原画像表示
8	出力画像

このように実装されたGUIアプリケーションにより、これまでと同様に高速な色強調処理を行えることを確認した。しかしながら現在の仕様では実行にあたり知識が必要となっており、実システムとして実装する際には病理医などのような色強調の知識がないユーザを考慮し、容易に扱えるシステムにする必要がある。そのため、より視覚的にインタラクティブな操作を行えるようインターフェースを改良する必要がある。また画像中の任意の箇所を指定してKL基底ベクトルを算出するなどといったような、現在実装できていない処理も必要になると考えられる。

3.5 第3章のまとめ

本章ではマルチスペクトル色強調技術に関する検討を行い、効果的な可視化を行うために、色強調に使用するための行列に関して新たな設計手法の提案を行った。提案手法では強調する波長帯域と表示に使用する色をそれぞれ任意に指定することにより、従来手法よりも効果的な可視化を実現し、さらに強調結果を表示する際に使用するスペクトルの決定方法についても代表的な手法の提案を行った。実験では病理画像や皮膚画像といった従来手法が適用されていた画像に加えて、一般的にマルチスペクトル画像が利用されているリモートセンシング分野の画像を使用することにより、提案手法の有効性を確認した。さらに実システムへの実装に向け、高速アルゴリズムの開発およびそれに基づくGUIアプリケーションの作製を行い、システムの実現可能性を示した。

第4章 デジタル染色手法に関する検討

4.1 はじめに

本章では、デジタル染色技術に関する検討を行う。本研究室ではマルチスペクトル画像を用いた H&E 染色標本中の定量化された線維領域の可視化手法として、H&E 染色標本画像から MT 染色標本画像を疑似的に生成するデジタル染色が提案されていた[33]。この画像解析手法では本来、細胞質と線維間を区別する情報としてエオジンにより生じるスペクトル特徴を利用していた。しかしながら実際にはヘマトキシリン(H)単染色標本中においても細胞質と線維の間においてスペクトルの形状に差異が存在することが報告されている[55]。H 単染色標本画像を用いて H&E 染色標本画像と同等の画像解析結果が得られる場合、H 単染色は H&E 染色と比べて染色工程が簡易であることや染色液が 1 つのみなので染色状態のばらつきが少ないことから、H 単染色標本を使用することは画像解析において非常に価値のあることと考えられる。ここでは H 単染色標本画像から H&E 染色標本画像を生成するデジタル染色手法の提案を行い、また同様のアプローチに基づき H 単染色標本画像からのデジタル MT 染色画像の作製、定量的評価を行う。実システム応用例として IHC 染色標本画像へのデジタル染色応用の提案も行う。

4.2 デジタル染色手法

ここでは先行研究で提案されたデジタル染色技術に関する説明を行い、従来手法と異なったアプローチを用いたデジタル染色手法の提案を行う。また提案するデジタル染色手法の背景となる基礎技術である色素量推定に関して、従来まで問題とされていた負値の推定色素量について非負制約を設けるためのアルゴリズムを開発する。

4.2.1 先行研究におけるデジタル染色

2.3.2 節で述べたように、本研究室の先行研究としてデジタル染色技術が開発されている。従来手法[33]は H&E 染色標本画像から MT 染色標本画像を生成するために提案された手法であり、本来は定量化された線維領域の可視化を目的としている(図 2.9 参照)。標本中の線維領域の占有率などは診断の重要な指標になり得るため、通常の病理診断では H&E 染色標本が用いられるが、必要に応じて MT 染色標本を使用することにより線維領域の観

察を行う。しかしながら実際には MT 染色標本の作製には多くの時間やコストがかかってしまう。このことから H&E 染色標本画像のみから線維領域の定量化を行えることは非常に価値のあることであり、診断支援などへの応用が期待される。画像から精度よく線維領域を識別できたとしても画素数などの数値データのみによる結果の提示では妥当性を確認することができないため、定量化結果を可視化し、画像のどの部分が線維領域として認識されているかを示すことにより画像解析手法の有意性を示すことができると考えられる。ここで可視化する手法として、普段線維の観察に使用されている MT 染色標本画像を疑似的に作製することにより、病理医へ与えるインパクトも大きくなり、また連続切片の MT 染色標本などと比較することによっても一般的に定量化データの妥当性を示すことができると考えられる。そのような評価により信頼できる精度の画像解析結果が得られた場合、最終的に MT 染色標本を作ることなく H&E 染色標本画像から作製したデジタル MT 染色標本画像を参照画像として線維領域の観察を行うといったような実応用が期待される。

4.2.2 色素量推定に基づくデジタル染色手法

4.2.1 節で記述したように、先行研究では H&E 染色標本画像から MT 染色標本画像を作製していた。過去の報告により、H&E 染色標本における細胞質と線維の間のスペクトルの差異はエオジン色素のスペクトルのシフトによるものであると考えられており[56]、従来のデジタル染色手法[33]では、組織分類を行いその結果に基づき H&E 染色から MT 染色へのスペクトル変換を行うことでデジタル MT 染色を実現していた。しかしながら最近の報告によると、H 単染色標本中においても細胞質と線維の間に微細なスペクトル形状の差異が存在していることがわかっている[55]。ランバートベール則が成り立っているとき、本来であれば単染色標本中のスペクトル形状は一定となるはずであることから、このスペクトルの差異は組織構造の違いによる散乱の影響であると考えられている。線維の組織構造の模式図を図 4.1 に示す[57]。

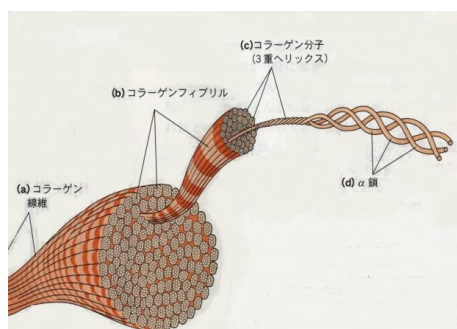


図 4.1 線維化組織における組織構造

もし H 単染色標本画像を用いて H&E 染色標本画像と同等の画像解析結果が得られるのであれば、H 単染色は H&E 染色と比べて染色工程が簡易であることや染色液が 1 つのみ

となり染色状態のばらつきが少ないことから、H 単染色標本を使用することは画像解析において非常に価値のあることと考えられる。ここでは H 単染色標本画像を使用した画像解析技術を目的とし、デジタル染色手法の提案を行う。デジタル MT 染色における主の目的は線維化領域の定量化であるが、これらの特徴量はデジタル MT 染色を行う過程で算出される情報を利用することで容易に求まると考えられる。

デジタル H&E 染色手法

まず単染色標本中の組織が異なるスペクトル特徴をもっていることを示すために、H 単染色標本画像から H&E 染色標本画像の作製を行う。これは細胞質と細胞核の間におけるスペクトル特徴の違いの可視化となっており、同様のアプローチを用いることによってデジタル MT 染色の提案を行う。従来手法では組織分類結果に基づきデジタル染色を行っていたが、本研究では色素量推定[37]に基づいた手法を提案する。

まず背景技術となる色素量推定について説明を行う。ランバートベール則より、ある点の波長 λ における吸光度 $a(\lambda)$ は、 K 個の色素の染色度合を表す色素量 (C_1, C_2, \dots, C_K) と各色素に対応した吸収係数 $(\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_K)$ による線形和、

$$a(\lambda) = \sum_{k=1}^K C_k \varepsilon_k(\lambda) \quad (4.1)$$

で表すことができる。ここで分光吸光度 $a(\lambda)$ と分光透過率 $t(\lambda)$ の間には、

$$a(\lambda) = -\log_{10} t(\lambda) \quad (4.2)$$

の関係が成り立つ。なお本論文では対象とする領域から平均分光吸光度を取得し、最大値を 1 として正規化したものを吸収係数として定義する。式(4.1)より、波長方向に L 次元でサンプリングされた分光吸光度は、行列を用いた離散モデルで表すことにより、

$$\begin{bmatrix} a(\lambda_1) \\ a(\lambda_2) \\ \vdots \\ a(\lambda_L) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \varepsilon_2(\lambda_1) & \cdots & \varepsilon_K(\lambda_1) \\ \varepsilon_1(\lambda_2) & \varepsilon_2(\lambda_2) & \cdots & \varepsilon_K(\lambda_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_1(\lambda_L) & \varepsilon_2(\lambda_L) & \cdots & \varepsilon_K(\lambda_L) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_K \end{bmatrix} \quad (4.3)$$

と書くことができる。式(4.3)を、

$$\mathbf{a} = \mathbf{X}\mathbf{C} \quad (4.4)$$

と表したとき、逆問題を解くことにより色素量を各要素にもつ色素量行列 \mathbf{C} を推定することができる。最小二乗法により求められる色素量推定行列は疑似逆行列、

$$\mathbf{X}^+ = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \quad (4.5)$$

となり、推定行列 \mathbf{X}^+ を吸光度ベクトル \mathbf{a} に乗算することによって推定色素量 $\hat{\mathbf{C}}$ を得る。H&E 染色標本を例とすると、染色液として使用されているヘマトキシリンおよびエオジン、また無染色の状態で吸収をもっている赤血球からなる 3 つの吸収係数を用いて色素量推定を行うことで、図 2.7(a)の原画像から図 2.7(b), (c)および(d)に示すような色素量推定結果

を得ることができる。

図 4.2 や図 4.3 に示すように、H 単染色標本はヘマトキシリン色素のみを用いて染色されているため、本来は組織の種類に関わらず同様の分光特性を示すと考えられる。つまり H 単染色標本画像の場合、式(4.1)はヘマトキシリンの色素量 C_H と吸収係数 $\varepsilon_H(\lambda)$ を用いて、

$$a_H(\lambda) = C_H \varepsilon_H(\lambda) \quad (4.6)$$

と表すことができる。しかしながら実際に画像から複数のサンプルを取得し細胞質と細胞核の分光吸光度を比較した場合、図 4.4 に示すようにスペクトル形状の違いが確認できる。

ここで細胞質から取得された吸収係数 $\varepsilon_{\text{Hcyto}}(\lambda)$ および細胞核から取得された吸収係数 $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$ 、またそれぞれの吸収係数による寄与を表した係数 C_{Hcyto} および C_{Hnuc} （以下、成分係数とする）を用いて、H 単染色標本中の分光吸光度を、

$$a_H(\lambda) = C_{\text{Hcyto}} \varepsilon_{\text{Hcyto}}(\lambda) + C_{\text{Hnuc}} \varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda) \quad (4.7)$$

とモデル化する。このとき細胞質の画素では C_{Hcyto} が、また細胞核の画素では C_{Hnuc} がより多いと考えられる。このモデルに基づき \hat{C}_{Hcyto} 、 \hat{C}_{Hnuc} を推定し、エオジンおよびヘマトキシリンの吸収係数 $\varepsilon_E(\lambda)$ 、 $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$ を使用し、

$$\hat{a}_{\text{HE}}(\lambda) = w_{\text{cyto}} \hat{C}_{\text{Hcyto}} \varepsilon_E(\lambda) + w_{\text{nuc}} \hat{C}_{\text{Hnuc}} \varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda) \quad (4.8)$$

と吸光度を復元することで、細胞質の領域はエオジン、細胞核の領域はヘマトキシリンの色で表示される、といったデジタル H&E 染色標本画像を生成することができる。ここで変数 w は各要素を調整するための重み係数である。例えば H 単染色標本中における細胞質領域は薄く染色されており、推定される成分係数が少ないことから、 w_{cyto} として比較的大きな値を使用することでエオジンの色を明瞭に表示することが可能となる。得られたデジタル H&E 染色標本画像の分光吸光度は式(4.2)の関係に基づき分光透過率に変換され、等色関数および照明光を用いた色再現により、RGB カラー画像として出力される。

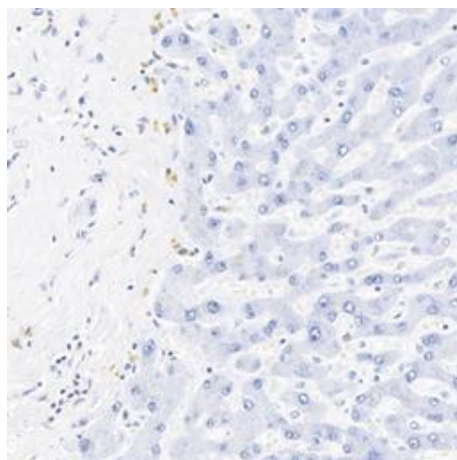


図 4.2 H 単染色標本画像

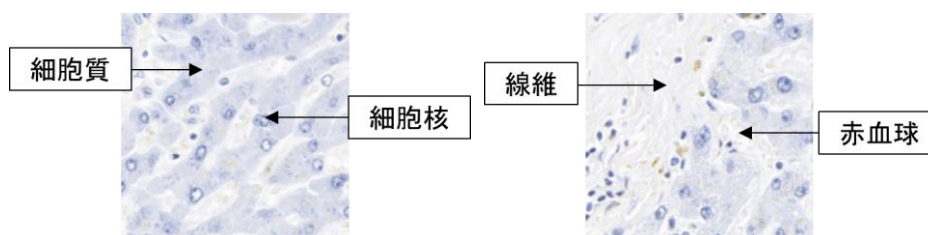


図 4.3 H 単染色標本における各組織

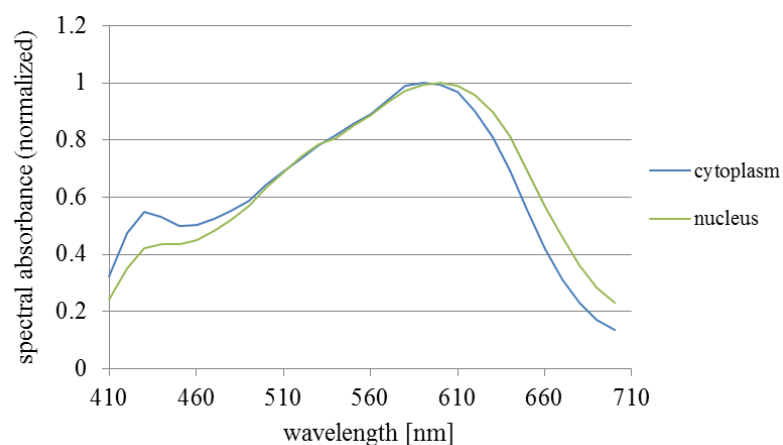


図 4.4 H 単染色標本における細胞質と細胞核の分光吸光度（最大値を 1 に正規化）

デジタル MT 染色手法

前述したデジタル染色手法に基づき，以下ではデジタル MT 染色手法のアルゴリズムについて説明を行う．H 単染色標本中の細胞質と線維における分光吸光度は図 4.5 に示す通りとなっており，形状の差が存在することから，前述したアプローチに基づきデジタル MT 染色を行える可能性がある．MT 染色標本は図 4.6 に示すように主に 4 つの色に大別でき，本手法を適用するためには細胞質，線維，細胞核，赤血球の 4 つの成分係数を求める必要がある．しかしながら H 単染色標本中におけるスペクトル特徴の種類が少ないことから，同時に 4 つの吸収係数を使用して各組織の成分係数を求めることは非常に困難とされている．そこでデジタル MT 染色では，分離しやすい組織から優先的に処理を行う階層的アルゴリズムを提案する．

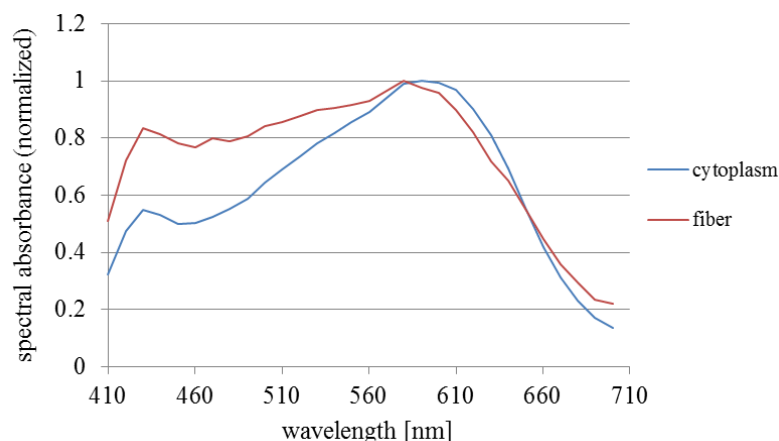


図 4.5 H 単染色標本における細胞質と線維の分光吸光度（最大値を 1 に正規化）

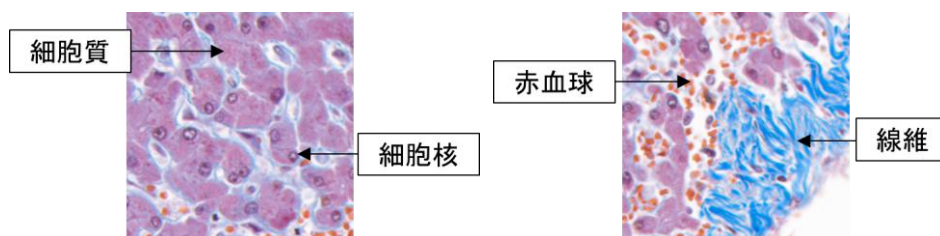


図 4.6 MT 染色標本における各組織

H 単染色標本では、ヘマトキシリンで染まりやすい細胞核、また無染色の状態でも吸収をもっている赤血球の色が濃く可視化されている。よって細胞核および赤血球の吸収係数を用いて成分係数推定を行った場合、これらの組織の画素で推定される成分係数は細胞質や線維といったその他の組織に比べて大きくなることが予測される。つまり、細胞核、赤血球の吸収係数 $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{Hbrc}}(\lambda)$ および成分係数 C_{Hnuc} , C_{Hbrc} により表現される吸光度モデル,

$$a_{\text{H}}(\lambda) = C_{\text{Hnuc}}\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda) + C_{\text{Hbrc}}\varepsilon_{\text{Hbrc}}(\lambda) \quad (4.9)$$

に基づき成分係数推定を行う。推定される成分係数 \hat{C}_{Hnuc} および \hat{C}_{Hbrc} は細胞核、赤血球の領域において大きくなるため、どちらかの成分係数がしきい値より大きかった場合、その画素を細胞核もしくは赤血球と判断し、MT 染色標本から取得した吸収係数 $\varepsilon_{\text{MTnuc}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{MTbrc}}(\lambda)$ を用いた吸光度モデル,

$$\hat{a}_{\text{MT}}(\lambda) = w_{\text{nuc}}\hat{C}_{\text{Hnuc}}\varepsilon_{\text{MTnuc}}(\lambda) + w_{\text{brc}}\hat{C}_{\text{Hbrc}}\varepsilon_{\text{MTbrc}}(\lambda) \quad (4.10)$$

に従って吸光度の復元を行う。ここで w_{nuc} および w_{brc} は細胞核と赤血球に対する重み係数である。一方、 \hat{C}_{Hnuc} , \hat{C}_{Hbrc} のどちらの成分係数もしきい値以下であった場合、細胞質や線維を含むその他の組織であるとみなし、細胞質と線維の吸収係数を使用して成分係数推定を行う。このときの吸光度モデルは、下記の通りとなる。

$$a_{\text{H}}(\lambda) = C_{\text{Hcyto}}\varepsilon_{\text{Hcyto}}(\lambda) + C_{\text{Hfib}}\varepsilon_{\text{Hfib}}(\lambda) \quad (4.11)$$

ここで $\varepsilon_{\text{Hfib}}(\lambda)$ および C_{Hfib} は H 単染色標本における線維の吸収係数、成分係数である。式 (4.11) に従い推定された成分係数 \hat{C}_{Hcyto} 、 \hat{C}_{Hfib} を利用して、MT 染色標本から取得した各組織の吸収係数 $\varepsilon_{\text{MTcyto}}(\lambda)$ 、 $\varepsilon_{\text{MTfib}}(\lambda)$ を用いて吸光度の復元を行う。すなわち復元されるデジタル MT 染色の吸光度は、

$$\hat{a}_{\text{MT}}(\lambda) = w_{\text{cyto}} \hat{C}_{\text{Hcyto}} \varepsilon_{\text{MTcyto}}(\lambda) + w_{\text{fib}} \hat{C}_{\text{Hfib}} \varepsilon_{\text{MTfib}}(\lambda) \quad (4.12)$$

で表される。先ほどと同様に w_{cyto} および w_{fib} は細胞質と線維に対する重み係数である。このように得られたデジタル MT 染色標本画像の分光吸光度は分光透過率に変換され、等色関数および照明光を用いた色再現により、RGB カラー画像として出力される。

非負制約付き成分係数推定

さらに本研究では非負制約付き成分係数推定を実装する。複数の吸収係数から算出された疑似逆行列を使用して成分係数推定を実行した場合、推定された値がマイナスとなる場合がある。成分係数が負値の場合、値を 0 とすることで色への影響を減らすことができるが、ある成分係数が負値をとることで他の成分係数の値が大きくなるのが問題となる。そのような問題の解決を図るために非負制約付きの成分係数推定アルゴリズムの開発を行う。

アルゴリズムの説明についてはある画素におけるものであり、同様の処理を対象画像の全画素に対して行うこととする。まず K 個の吸収係数を使用して、対応した K 個の成分係数の算出を行う。ここですべての k に対して成分係数 C_k が 0 以上であれば、処理を終了しそれらをその画素における成分係数とする。そうでない場合、ある成分係数を 0 と固定し、少ない吸収係数を用いて成分係数推定、つまり $K-1$ 個の吸収係数による成分係数推定を全ての吸収係数の組み合わせに対して行う。例として $K=3$ の場合、 $(\varepsilon_1, \varepsilon_2)$ 、 $(\varepsilon_1, \varepsilon_3)$ および $(\varepsilon_2, \varepsilon_3)$ の組み合わせからそれぞれに対する成分係数推定行列を算出し、成分係数 (C_1, C_2) 、 (C_1, C_3) および (C_2, C_3) の推定を行う。 ${}_K C_{K-1} = K$ 個の組み合わせに対する成分係数推定結果より、全ての成分係数が負値をとらないときの結果を成分係数として採用し、複数の組み合わせにおいて非負制約を満たす場合には、式(4.1)に基づき吸光度を復元した際に元の吸光度との二乗誤差が最小となるものを最終的な成分係数の組み合わせとする。全ての組み合わせにおいて負値をとった場合、2つの成分係数を 0 に固定した、 $K-2$ 個の吸収係数を用いた成分係数推定を ${}_K C_{K-2}$ 通りの組み合わせに対して行う。このような処理を繰り返し全ての成分係数が正になるまで推定を行い、非負成分係数 (C_1, C_2, \dots, C_K) を得る。デジタル染色アルゴリズムにおける成分係数は、全て上記の手法により得られる非負成分係数 (C_1, C_2, \dots, C_K) を使用するものとする。なお本論文では分光吸光度の最大値を 1 に正規化したものを吸収係数として使用することで、成分係数推定や吸光度の復元といった全ての処理を行う。

IHC 染色標本画像へのデジタル染色応用

デジタルH&E染色技術の応用として、IHC染色標本を用いたシステムを提案する。IHC染色は抗体を用いて組織標本中の抗原を検出する手法であり、陽性核や細胞膜といった特定の組織を発色させることができる。IHC染色標本では観察した組織のコントラストが高いため指標の算出が簡単となっていることから、臨床応用可能な製品化されている技術[13]を含む様々な画像解析技術が開発されている[58-60]。ここではKi-67抗体を用いたIHC染色標本を扱う。Ki-67染色標本では陽性の核が検出され、ジアミノベンジジン(DAB)との反応を行い褐色に発色させることで陽性核の可視化を行う。図4.7にTissue Microarray(TMA)より撮影されたKi-67染色肝臓標本画像を示す。図にも示すように、Ki-67染色標本では正常な核を可視化するためにヘマトキシリンによる染色を行う。ヘマトキシリンのみによる染色では細胞質のコントラストが低く、細胞の構造を観察するのが難しいことから、通常は連続切片のH&E染色標本(図4.8)を参照しながら観察を行う。しかしながら連続切片の標本は隣あっている組織切片であり、全く同じ形状をしていることはない。そこでIHC染色標本にデジタルH&E染色を応用し細胞質の領域をエオジンの色で表示することができれば、細胞質領域のコントラストが高くなり同一切片の標本で細胞構造の観察を行うことが可能となる。このようなデジタル染色画像を参照画像として観察を行うビューアシステムを想定した、IHC染色標本画像に対するデジタルH&E染色の応用が考えられる。

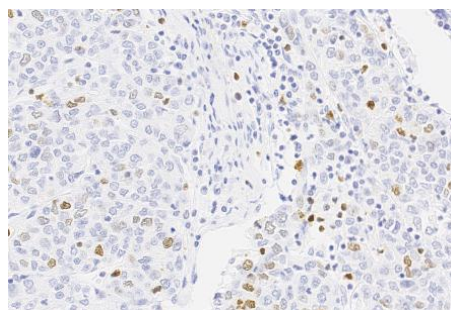


図 4.7 Ki-67 染色肝臓標本画像 (TMA より撮影)

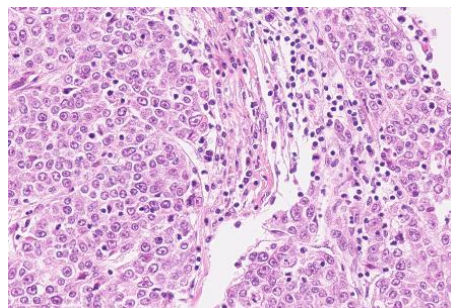


図 4.8 H&E 染色肝臓標本画像 (TMA より撮影)

4.3 実験

前節で提案したH単染色標本画像からのデジタル染色手法を実際のマルチスペクトル画像に適用することによりその効果を確認する．まず前述した非負制約付き成分係数推定を標本画像に対して適用し，定量的な評価を行うことで手法の妥当性を示す．そして提案したデジタルH&E染色およびデジタルMT染色を適用し結果画像の観察を行う．

4.3.1 非負制約付き成分係数推定の評価

前節で提案した非負制約付き成分係数推定を実際の画像に対して適用し，手法の妥当性評価を行う．ここでは図4.9に示すH&E染色肝臓標本画像（国立がんセンター製）をテスト画像として使用する．画像は液晶チューナブルフィルタVariSpecを利用したマルチスペクトル顕微鏡システム [図2.6(b)] により対物レンズ40倍で撮影され，撮影波長帯域を410-710nm，波長方向のサンプリング間隔を10nmとした31バンドのマルチスペクトル画像となっており，画像サイズは1320×1000画素である．

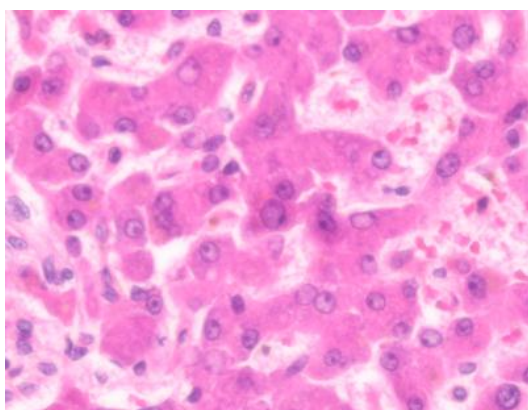


図 4.9 H&E 染色肝臓標本画像（VariSpec 撮影，40 倍）

VariSpec を使用して撮影されたマルチスペクトル画像はフィルタ特性の影響による波長間の画素ずれが存在しており，色再現画像では認識できないレベルのずれであっても画像処理を行うと画素ずれが顕著に現れる可能性がある．そこで本章のVariSpec撮影画像を使用した実験では，1344×1024画素で撮影された原画像に対して，正規化相互相関を利用した簡単な画素ずれ補正を行い中央の1320×1000を切り出したものを使用する．正規化相互相関係数は次式で表される．

$$NCC = \frac{M \sum_{j=1}^M g_{ij} g_{rj} - \sum_{j=1}^M g_{ij} \sum_{j=1}^M g_{rj}}{\sqrt{M \sum_{j=1}^M g_{ij}^2 - \left(\sum_{j=1}^M g_{ij} \right)^2} \sqrt{M \sum_{j=1}^M g_{rj}^2 - \left(\sum_{j=1}^M g_{rj} \right)^2}} \quad (4.13)$$

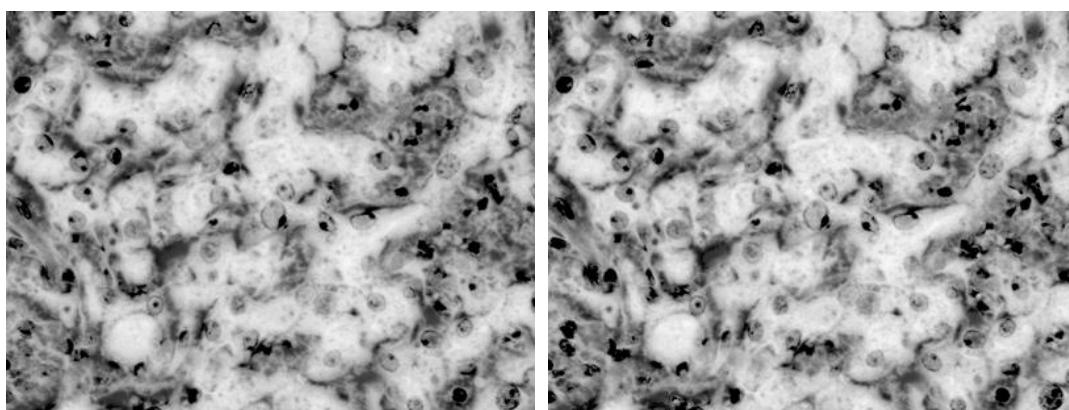
この式により算出される定数は search area 内のある画素に対する正規化相互相関係数を表し、 M は window の画素数、また g_{ij} と g_{rj} はそれぞれ入力画像および参照画像における M 画素内の j 画素目の信号値である。入力画像と参照画像との類似性が高いとき係数は大きくなり、同一の信号が入力された場合、相関係数は最大の 1 をとる。ある基準波長における波長画像を原画像とし適当なサイズの window を用いて、入力画像となる他の波長画像における window 基準点から水平垂直方向に対して ± 10 画素の範囲の search area で走査を行い、正規化相互相関係数が最大となるような対応点を探索する。基準点と算出された対応点が重なるように各画素をシフトさせることによって画素ずれ補正を行う。なお今回は基準波長を 410nm として画素ずれ補正を行った。

図 4.9 に示す画像の細胞質、細胞核、赤血球の各領域から 5×5 画素の ROI を 50 点取得し、各組織の平均分光透過率を算出したのち分光吸光度、さらに吸収係数へと変換する。今回提案した非負成分係数推定と比較するための従来手法として、(1)負値を許容する、(2)負値を 0 にする手法を適用した。推定された成分係数画像を図 4.10 に示す。画像はそれぞれ成分係数の 0 から最大値を 0 から 255 まで割り当てたグレースケール画像となっている。負値を許容する手法では画像化する際に負値を 0 にするため同じ結果が得られることから、ここでは比較結果として負値を 0 にしたもののみを示す。

また推定成分係数 ($\hat{c}_{cyto}, \hat{c}_{nuc}, \hat{c}_{rbc}$) を使って式(4.1)に基づき吸光度 \hat{a}_{HE} を復元し、RGB 画像へ変換したものを図 4.11 に示す。負値を 0 とする手法と比較して、負値を許容した手法や提案した非負制約付き成分係数推定の結果の方が、原画像と近い画像が得られていることを確認した。さらに推定された分光吸光度 \hat{a}_{HE} と元の分光吸光度 a_{HE} の平均二乗誤差 (Mean Square Error, MSE) を残差として画素ごとに算出し、画像化したものを図 4.12 に示す。MSE の算出式は、

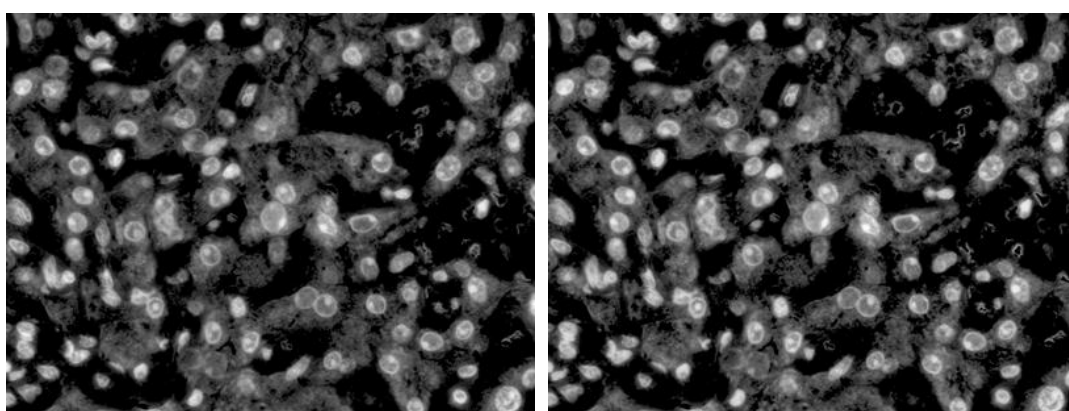
$$MSE = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M [I_i(j) - I_r(j)]^2 \quad (4.14)$$

となっており、 M はサンプル数、 $I_i(j)$ は入力信号値、 $I_r(j)$ は参照信号値であることから、今回は $M = N = 31$ 、 $I_i(j)$ は推定された吸光度 $\hat{a}_{HE}(\lambda)$ 、 $I_r(j)$ は元の吸光度 $a_{HE}(\lambda)$ として計算を行い、各画素の MSE 算出を行った。算出された MSE の画像化にあたり、今回比較した 3 つの手法の結果のうち最も大きかった MSE 値を最大値とし、0 から最大値までの MSE を 0 から 255 に割り当てたグレースケール画像を作製した。



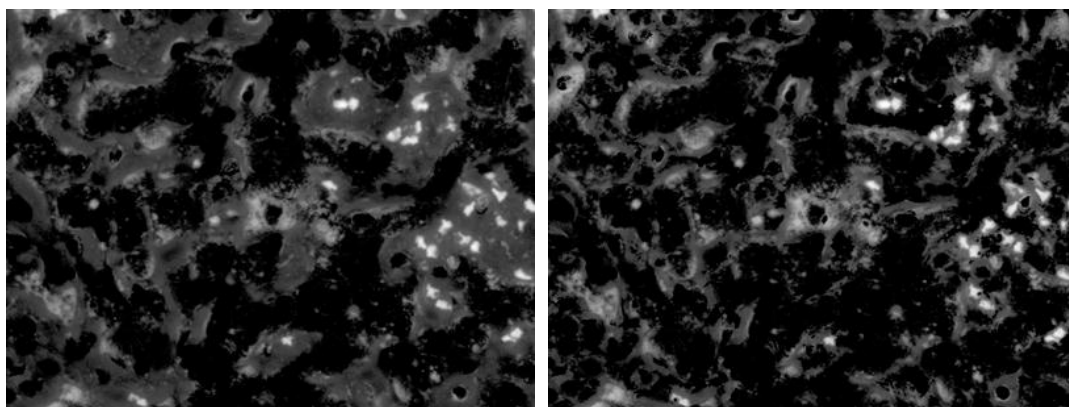
(a) 細胞質成分係数画像 (負値を 0)

(b) 細胞質成分係数画像 (非負制約)



(c) 細胞核成分係数画像 (負値を 0)

(d) 細胞核成分係数画像 (非負制約)



(e) 赤血球成分係数画像 (負値を 0)

(f) 赤血球成分係数画像 (非負制約)

図 4.10 H&E 染色標本画像から推定された成分係数画像

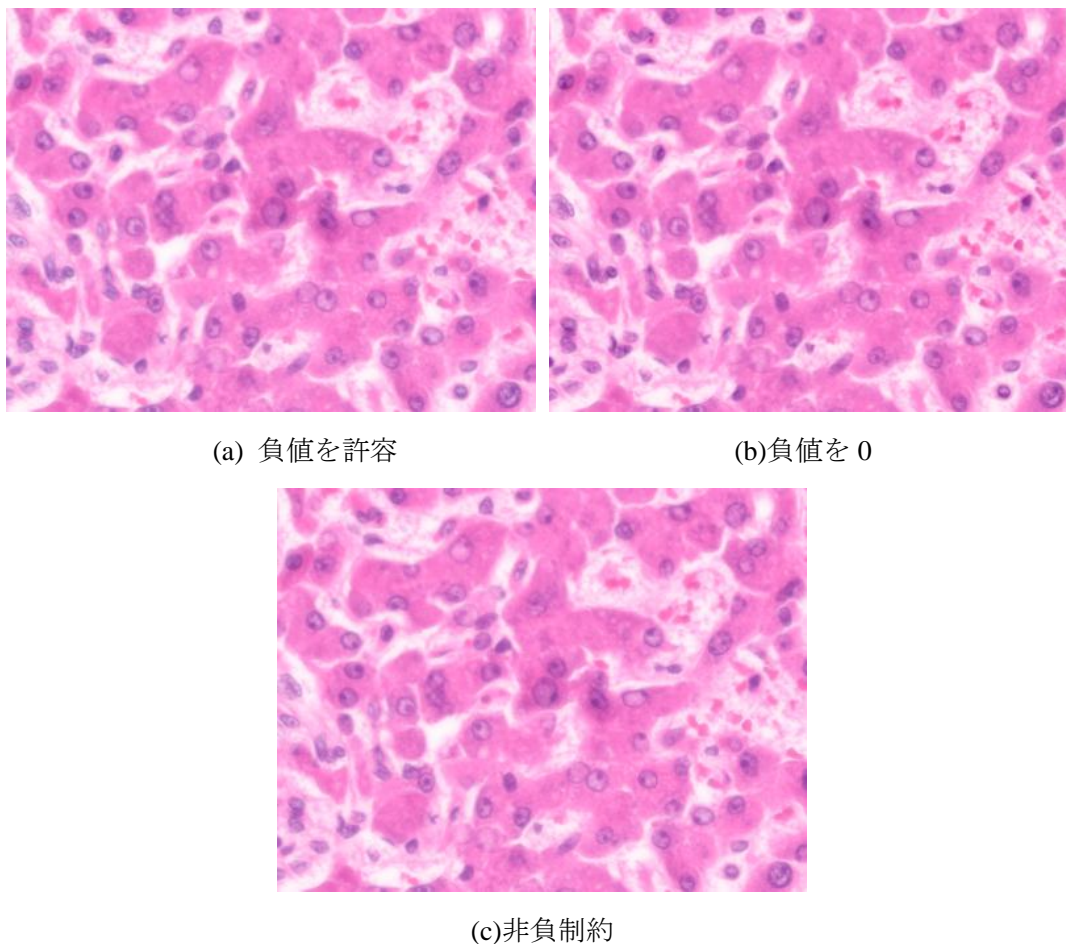


図 4.11 推定成分係数から復元された H&E 染色標本画像

結果より、負値を許容した手法や提案した非負制約付き成分係数推定により、残差が減少していることがわかる。これらの結果について定量的な評価を行ったものを表 4.1 に示す。表はそれぞれ復元した吸光度と元の吸光度から算出される CIE $L^*a^*b^*$ 色差、画像全体の MSE、画像中の最大の値をとる画素の MSE を示したものであり、数値データとしても提案手法により負値を許容した手法と近い結果を得られていることが確認できる。負値を許容した手法は制約がないため、成分係数から吸光度を復元した際に最も高い精度を得ることができる。しかしながら今回提案しているデジタル染色をはじめとする画像解析技術を実行する場合、成分係数が負値をとることは大きな問題となる。また実際に染色は色素の重ね合わせにより行われており、マイナスの値が出ることは物理的観点からも望ましいことではなく、非負制約を設けることは妥当であると考えられる。一方で提案した非負制約付き成分係数推定では、負値を 0 としたときよりも色差や MSE を小さくすることに成功しており、非負制約を有しながらも、負値を許容する手法と近い結果を得ている。以上の実験から、提案した非負制約付き成分係数推定手法の妥当性を確認することができた。次節以降の実験では、すべての成分係数推定に本手法を用いることとする。

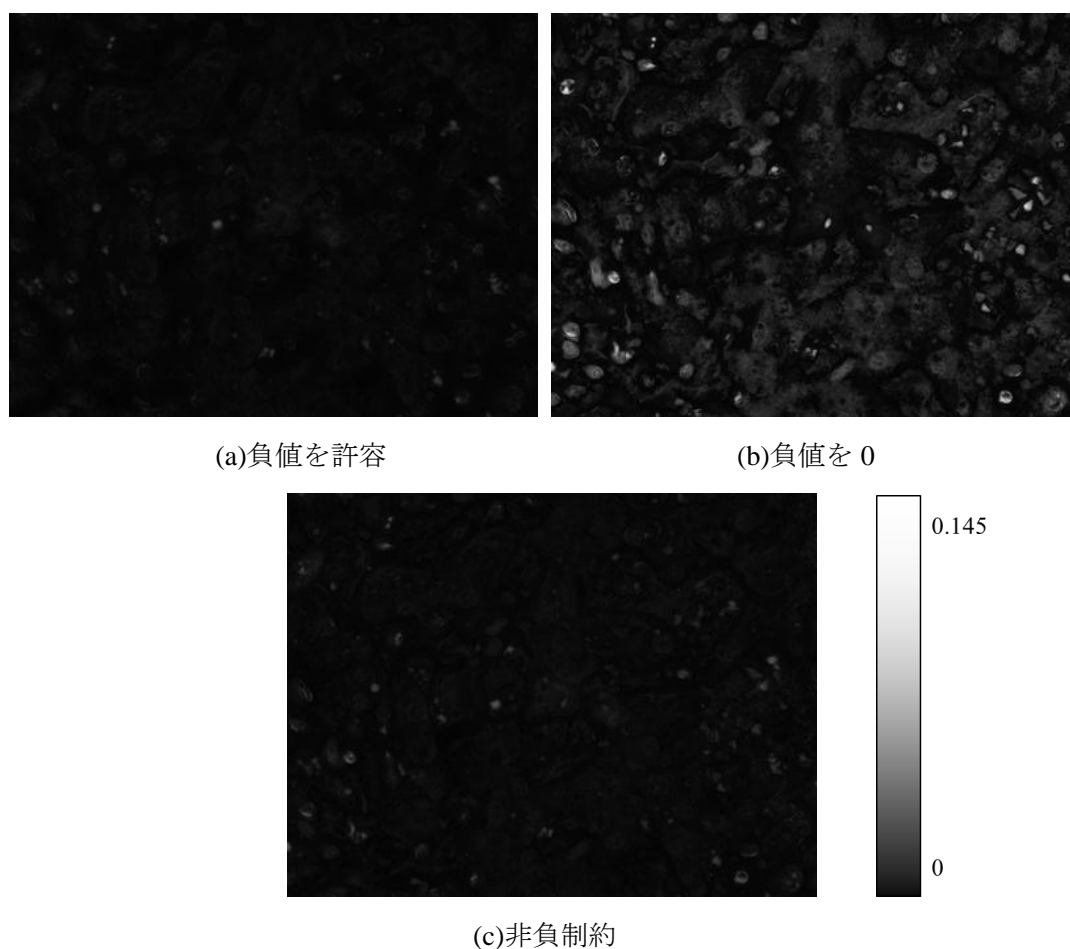


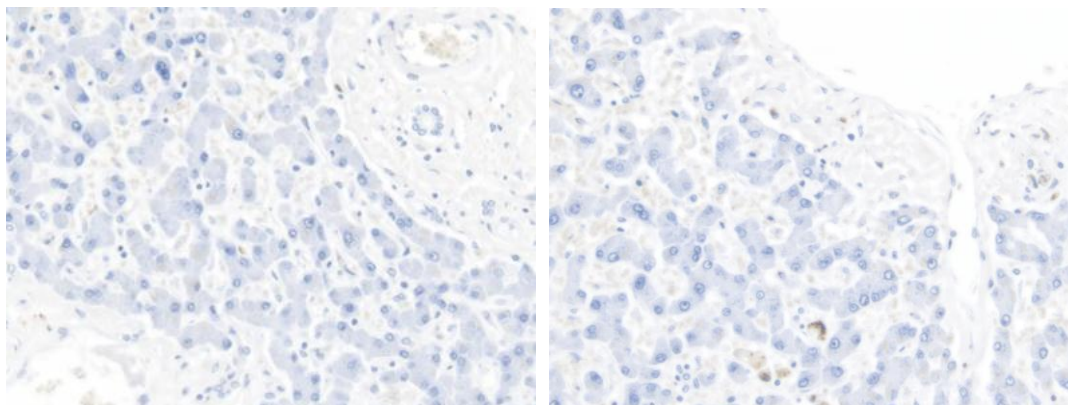
図 4.12 分光吸光度残差画像

表 4.1 MSE および色差の比較

成分係数推定手法	平均 ΔE	全体 MSE	最大 MSE
負値を許容	1.43	0.000129	0.0131
負値をゼロ	2.83	0.00117	0.145
非負制約	1.83	0.000188	0.0170

4.3.2 H 単染色標本画像からのデジタル H&E 染色

実際の H 単染色標本画像に対して提案したデジタル H&E 染色手法を適用する。画像は前実験と同様に VariSpec を用いた撮影システムにより取得され、撮影波長帯域を 410-710nm、波長方向のサンプリング間隔を 10nm とした 31 バンドのマルチスペクトル画像となっており、画像サイズは画素ずれ補正処理を行って得られた 1320×1000 画素である。なお今回の撮影倍率は対物レンズ 20 倍とした。実験に使用する H 単染色肝臓標本画像（国立がんセンター製）を図 4.13 に示す。



(a) 領域 1

(b) 領域 2

図 4.13 H 単染色肝臓標本画像 (VariSpec 撮影画像, 20 倍)

この画像の細胞質および細胞核から取得した吸収係数を使用し、デジタル H&E 染色を行う。復元の際のエオジンの吸収係数 $\varepsilon_E(\lambda)$ は、図 4.14 に示すエオジン(E)単染色肝臓標本画像における細胞質領域から取得された。また最適な重み係数として $w_{\text{cyto}} = 12$, $w_{\text{nuc}} = 1.5$ を実験的に得た。デジタル H&E 染色の結果を図 4.15 に示す。結果より、使用した画像との連続切片である実際の H&E 染色標本画像 (図 4.16) と比較しても、かなり近い結果が得られていることが確認できる。細胞核において若干色の違いが見受けられるが、これは H&E 染色標本では細胞核はヘマトキシリンとエオジンの両色素によって染められているのに対し、吸光度復元の際に H 単染色標本から取得した吸収係数を使用しているためである。復元の際に H&E 染色標本の細胞核から取得した吸収係数を使用することにより、より実物の H&E 染色標本に近い結果を得ることが可能になると考えられる。本来定量的な評価を行えることが望ましいが、連続切片の組織標本と比較するような数値評価を行うことは難しい。そこで H 単染色標本を作製しマルチスペクトル画像を撮影、さらにエオジンで染色を行うことにより同一の切片における H&E 染色標本を作製することができれば、色差などを用いた定量的評価の実現が可能となり、今後の展望として期待される。

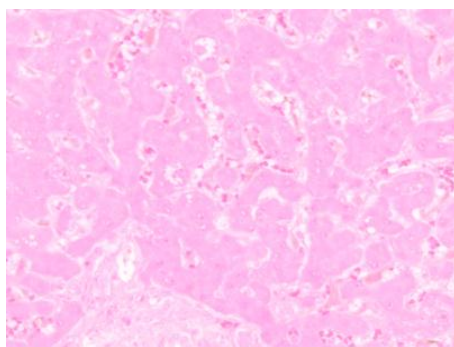
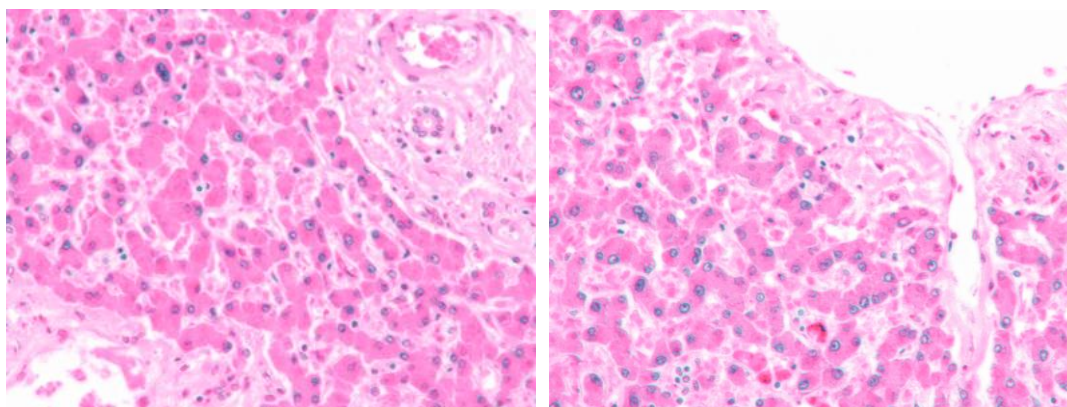


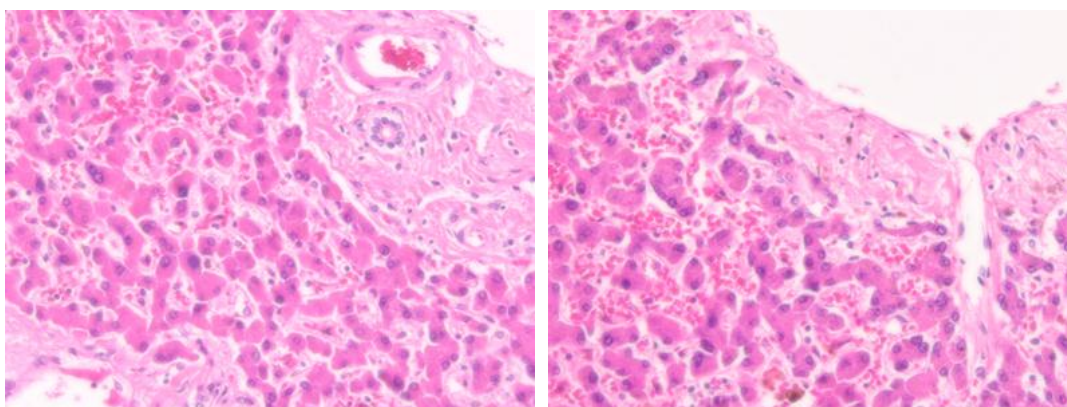
図 4.14 E 単染色肝臓標本画像 (VariSpec 撮影画像, 20 倍)



(a) 領域 1

(b) 領域 2

図 4.15 デジタル H&E 染色画像



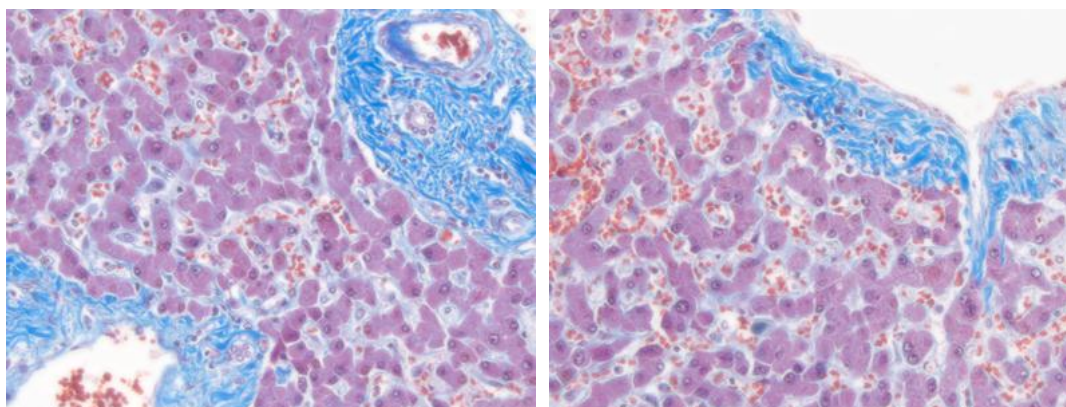
(a) 領域 1

(b) 領域 2

図 4.16 H&E 染色肝臓標本画像 (連続切片)

4.3.3 H 単染色標本画像からのデジタル MT 染色

次に提案したデジタル MT 染色手法を H 単染色標本画像に対して適用しその結果を確認する. 実験に使用する画像には前実験と同様に図 4.13 に示す H 単染色肝臓標本画像を使用する. H 単染色標本の各組織の吸収係数 $\varepsilon_{\text{Hcyto}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{Hfib}}(\lambda)$ および $\varepsilon_{\text{Hfbc}}(\lambda)$ はこれらの画像中の各組織領域から取得した分光透過率を変換することにより得る. また, MT 染色標本の吸収係数 $\varepsilon_{\text{MTcyto}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{MTnuc}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{MTfib}}(\lambda)$ および $\varepsilon_{\text{MTfbc}}(\lambda)$ は図 4.17 に示す連続切片の MT 染色標本画像中の各組織領域から取得された.



(a) 領域 1

(b) 領域 2

図 4.17 MT 染色肝臓標本画像（連続切片）

提案したデジタル MT 染色手法を画像に適用するにあたり，階層的処理のためのしきい値決定を行う．しきい値の決定はサンプルを用いた事前の成分係数推定により行われる．吸収係数の算出に用いた H 単染色標本画像中の各組織 50 点ずつの分光吸光度に対して，式(4.9)に基づき非負制約付き成分係数推定を行った．各吸光度から推定された成分係数 \hat{C}_{Hnuc} と \hat{C}_{Hrbc} をプロットしたものを図 4.18 に示す．図中の成分係数の分布より，細胞核および赤血球に対するしきい値をそれぞれ $T_{\text{nuc}} = 0.35$ ， $T_{\text{rbc}} = 0.07$ とした．

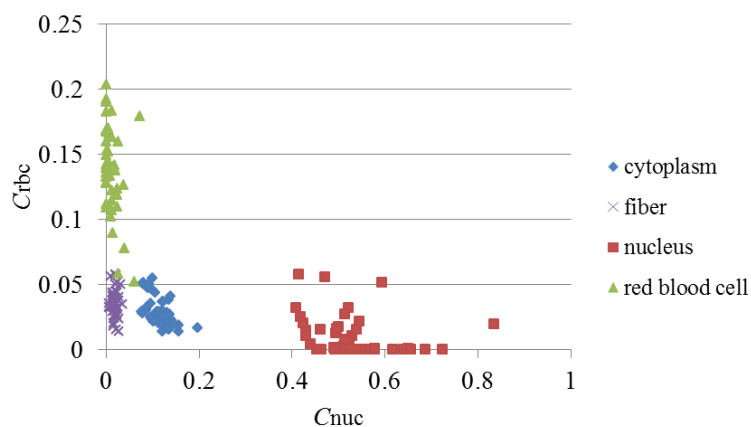


図 4.18 H 単染色標本の各組織から推定された細胞核と赤血球の成分係数

また細胞質と線維の吸収係数から分光吸光度を復元する際に，線維領域においても推定される線維の成分係数 \hat{C}_{Hfib} が細胞質と比較して小さいことから，重み係数 w_{fib} として大きな値を用いる必要がある．そのとき線維以外の領域において推定されたわずかな成分係数まで大きく増幅され，デジタル MT 染色画像中において濃い青色で表示されるといった問題が予測される．そこで推定された線維の成分係数 \hat{C}_{Hfib} に対して非線形な処理を適用す

ることで、微小な線維の成分係数が画像へ与える影響を低減する。線維に対するしきい値 T_{fib} を設定し、推定された成分係数 \hat{C}_{Hfib} がしきい値 T_{fib} よりも小さいとき、非線形な演算として次式による成分係数の更新を行う。

$$\hat{C}'_{\text{Hfib}} = T_{\text{fib}} \left(\frac{\hat{C}_{\text{Hfib}}}{T_{\text{fib}}} \right)^{\gamma} \quad (4.15)$$

今回の実験では $\gamma=1.5$ とし、図 4.19 に示す細胞質と線維の吸光度に対する成分係数 \hat{C}_{Hcyto} と \hat{C}_{Hfib} の推定結果よりしきい値を $T_{\text{fib}} = 0.25$ と決定した。また各組織に対する重み係数として、 $w_{\text{cyto}} = 3$, $w_{\text{nuc}} = 12$, $w_{\text{fib}} = 1.8$, $w_{\text{tbc}} = 6$ を実験的に得た。

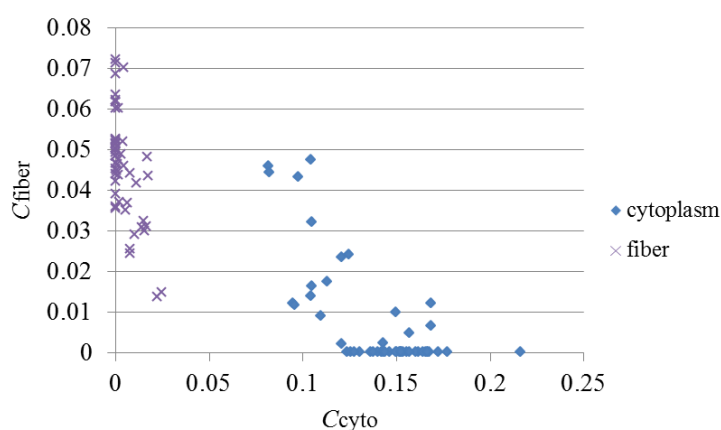


図 4.19 H 単染色標本の各組織から推定された細胞質と線維の成分係数

以上の条件のもと、デジタル MT 染色を適用した結果を図 4.20 に示す。結果より、図 4.17 に示した連続切片の MT 染色標本画像とある程度近い画像が得られていることを確認できる。赤血球のフチなどで若干のエラーが生じており、色に関する改善などが必要であると考えられているが、デジタル染色の本来の目的が定量化情報の可視化であるため厳密に色を合わせる必要はない。定量化されたデータの方がより重要となるため、ここでは連続切片標本（図 4.17）を参照画像とすることにより定量化データの比較を行う。連続切片の画像はなるべく同じ領域になるよう撮影され、完全に一致はしていないものの、かなり近い組織分布をしており十分な評価指標になり得ると考えられる。

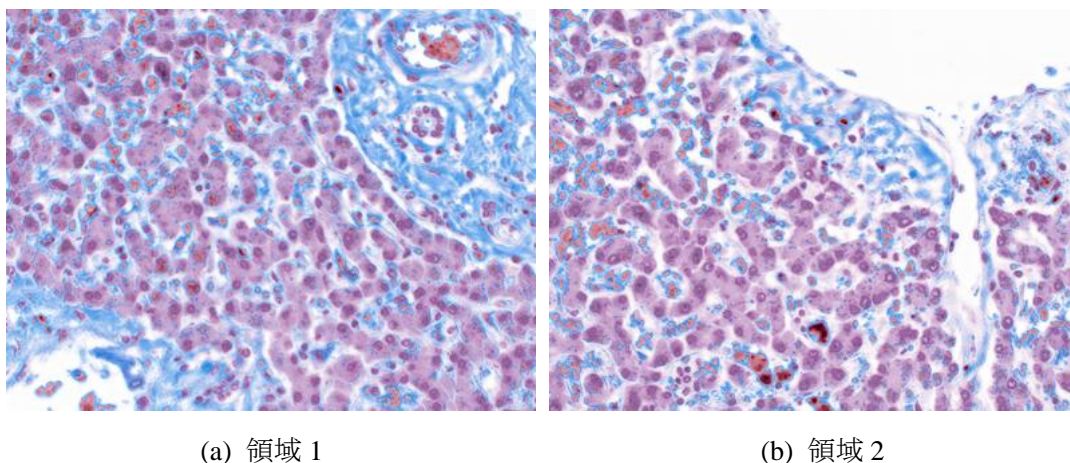
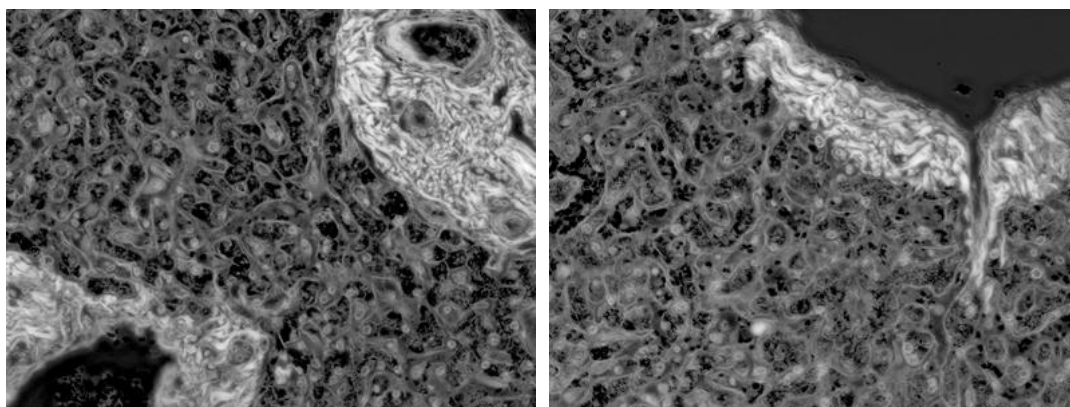


図 4.20 デジタル MT 染色画像

本研究における線維領域の定量化手法として、画素数から算出される全組織に対する線維領域の占有率を用いる。参照画像中の線維定量化には細胞質、線維、赤血球の3つの吸収係数による成分係数推定を利用する。これら3つの吸収係数 $\varepsilon_{\text{MTcyto}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{MTfib}}(\lambda)$ および $\varepsilon_{\text{MTtrbc}}(\lambda)$ を用いて MT 染色標本画像に対する成分係数を推定すると、線維に対する成分係数 \hat{C}_{MTfib} として図 4.21 のような推定結果を得ることができる。このうち対象とする線維領域のみを抽出するために、残りの成分係数 \hat{C}_{MTcyto} および \hat{C}_{MTtrbc} をしきい値処理することにより線維領域の画素を抽出する。MT 染色標本画像の各組織のサンプル吸光度を使用することにより実験的にしきい値の決定を行い、今回は $\hat{C}_{\text{MTfib}} > 0.3$ かつ $\hat{C}_{\text{MTcyto}} < 0.2$ かつ $\hat{C}_{\text{MTtrbc}} < 0.2$ であった場合に、対象の画素を線維と見なすことにした。また空白の領域は組織として無視するため、すべての推定成分係数が 0.1 より小さい場合、その画素を空白領域と見なし有効画素から除いた。線維占有率は次式により求まる。

$$O_{\text{fiber}} = \frac{\text{FiberPixels}}{\text{ValidPixels}} \times 100 \quad [\%] \quad (4.16)$$

FiberPixels はしきい値処理により線維と見なされた画素の数、また *ValidPixels* は組織領域の画素数であり画像全体の画素数から空白領域の画素数を差し引いたものに相当する。



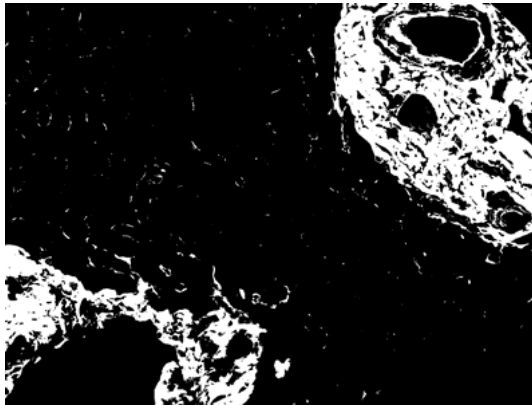
(a) 領域 1 (b) 領域 2
 図 4.21 MT 染色標本画像から推定された線維の成分係数

一方で、H 単染色標本画像からの線維定量化でも成分係数 \hat{C}_{Hfib} を用いた定量化を行う。図 4.21 に示した分布および前述した可視化の際のしきい値 T_{fib} を利用し、 $\hat{C}_{\text{Hfib}} > 0.025$ かつ $\hat{C}_{\text{Hcyto}} < 0.05$ となる場合に、対象画素を線維領域とした。また空白領域の決定は図 4.18 を参考に、 $\hat{C}_{\text{Hfib}} < 0.01$ もしくは $\hat{C}_{\text{Hcyto}} < 0.01$ となるとき対象画素を空白領域として見なし、占有率の計算から除外した。こうして計算される線維領域と組織領域の画素数を用いて、式 (4.16) に従い線維領域の占有率計算を行う。

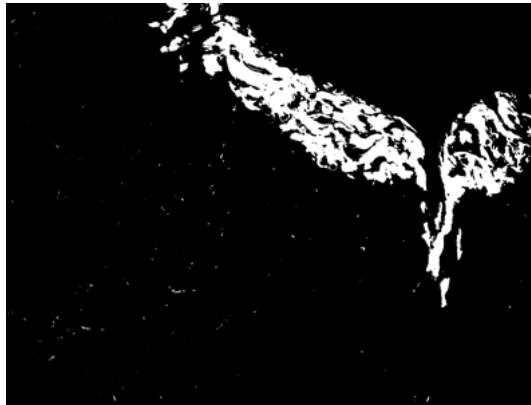
以上の手順における各画像からの線維定量化結果を表 4.2 に示す。また、MT 染色標本画像および H 単染色標本画像における線維領域と空白領域の領域抽出結果を図 4.22 および図 4.23 に示す。図は白い画素がそれぞれ線維領域の画素、空白領域の画素に対応しており、(b)、(d) の黒く表示されている箇所が組織領域として *ValidPixels* に数えられている。表より H 単染色標本画像からの定量化では、組織占有率が MT 染色標本のもの比べて多くなっている。使用している標本は連続切片ではあるが、精度よく線維の抽出が行えている場合、ここまで大きな差は生じないものと考えられる。図 4.23 に示した画像からもわかるように、H 単染色標本画像では、赤血球のフチおよび周囲の画素が線維領域として抽出されており、これらが主な誤差の原因となっていることが予測される。このようなエラーをなくすことが今後の課題として挙げられ、今回の手法は画素単位での処理となるが空間情報の利用などによる結果の改善も見込める。また本実験では 2 枚の撮影画像のみを使用して評価を行ったが、標本全体に対して処理を行い小領域ごとの結果を統計的に解析することでより信頼性の高い評価を行えると考えられる。このように画像解析手法の評価を行う上でも、マルチスペクトル WSI を作製することにより得られるメリットがある。

表 4.2 定量化データの比較

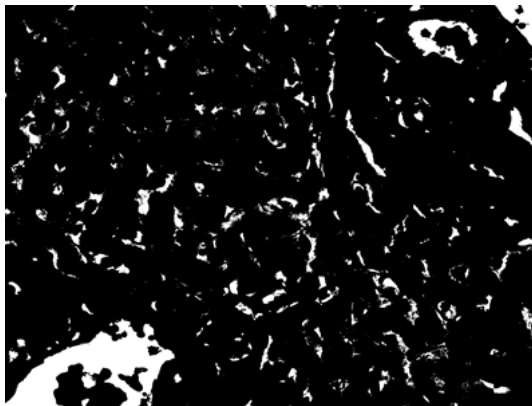
画像		線維画素数[pixel]	有効画素数[pixel]	線維占有率[%]
MT 染色標本画像	領域 1	215689	1208420	17.8
	領域 2	104233	1138389	9.16
H 単染色標本画像	領域 1	308292	1256292	24.5
	領域 2	161143	1104607	14.6



(a) 線維領域画素 (領域 1)



(b) 線維領域画素 (領域 2)



(c) 空白領域画素 (領域 1)



(d) 空白領域画素 (領域 2)

図 4.22 MT 染色標本画像からの領域抽出結果

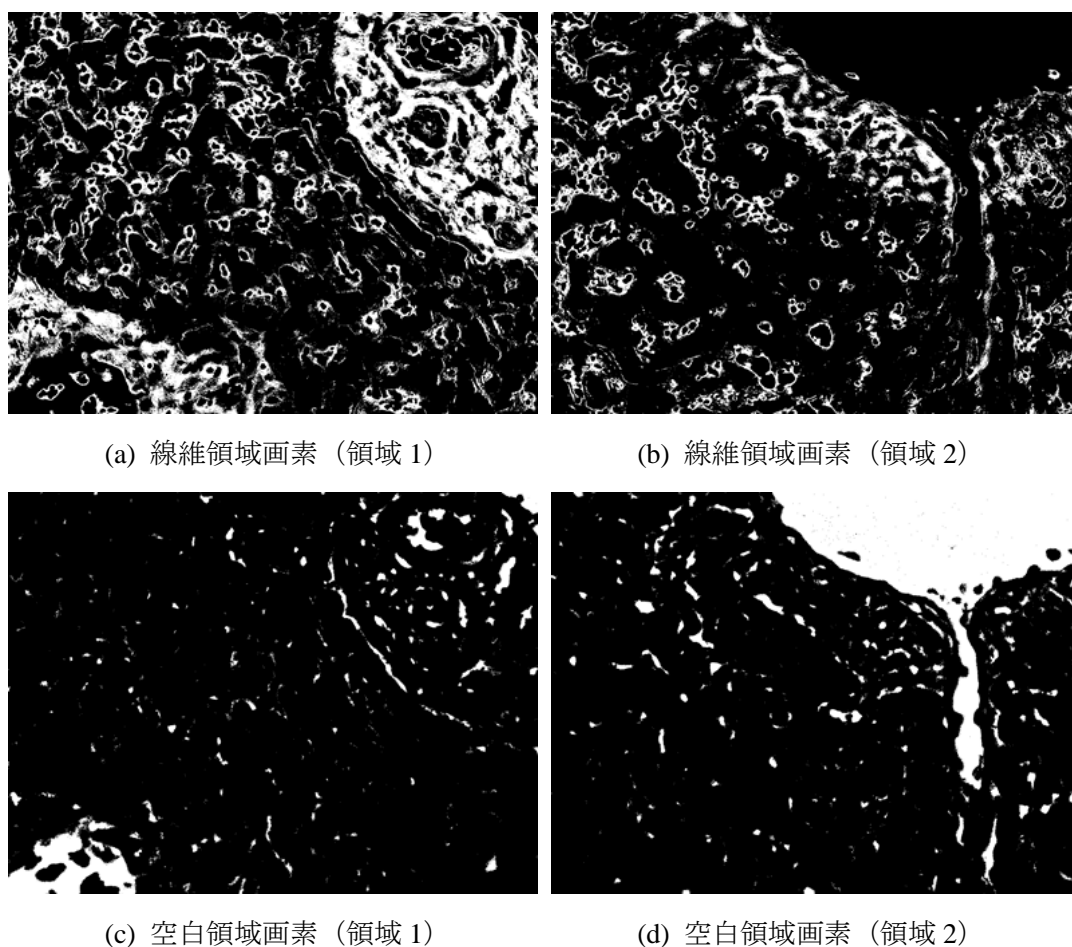


図 4.23 H 単染色標本画像からの領域抽出結果

4.4 第 4 章のまとめ

本章ではデジタル染色技術に関する検討を行った。本研究では先行研究である色素量推定手法に基づいたデジタル染色アルゴリズムの開発を行い、H 単染色標本画像からデジタル H&E 染色画像およびデジタル MT 染色画像の作製を行った。これまでの先行研究では H&E 染色標本から MT 染色標本を作製するデジタル染色手法が提案されていたが、H 単染色標本画像からもある程度良好なデジタル染色画像が得られることを確認した。H 単染色標本を用いて H&E 染色標本の画像解析結果と同等の結果を得られることは非常に価値のあることであり、実応用を想定した際に画像解析用途の標本作製が簡易になることはコストや時間の削減につながる。ただまだ精度が不十分であることや弾性線維の検出も重要となることから、今度の処理の改善が望まれる。また IHC 染色標本へのデジタル H&E 染色手法の応用について提案を行った。

第5章 WSI 品質管理のための No-reference 画質評価

5.1 はじめに

前章までにマルチスペクトル画像のための画像解析技術に関する検討を行った。提案した画像解析技術を標本全体に適用することを考えるが、撮影されたマルチスペクトル WSI のスペクトル情報が正しく取得できていなかった場合、精度の低い画像処理結果が得られると予測される。マルチスペクトル WSI の取得に際し、ぼけやノイズといった要因による画質の劣化はスペクトルデータの劣化につながるため、撮影された画像の質を評価し品質管理を行うことは重要である。本章では WSI 品質管理のための参照画像を用いない画質評価手法の提案を行う。なおここでは基礎検討として RGB 画像ベースでの手法提案、また妥当性評価を行っていく。

5.2 WSI 品質管理のための No-reference 画質評価手法

撮影された画質の評価を行うことは画像データの品質を管理するため、また WSI スキャナ自体の評価のためにも非常に重要である。現在、WSI の画質評価は人の主観評価により行われているが、この手法は多くの時間やコストが必要なことに加え、個人の知覚のばらつきや観測者の疲労が存在するため非効率となる。一方で、一般的な画像処理分野において客観的な画質評価のために MSE や Peak Signal-to-Noise Ratio(PSNR)、またはその他の客観指標が使用されている[61-63]。しかし MSE をはじめとする多くの客観評価指標が、劣化なしの理想画像を参照画像として必要とする。実応用を想定した場合、WSI に限らず撮影された画像の理想的な参照画像を得ることはできず、参照画像なしで画質評価を行う必要がある。このような目的のために、参照画像を用いない画質評価手法として No-reference(NR)画質評価手法が開発されているが、提案されている手法の多くが画質の劣化要因としてぼけあるいはノイズのどちらかのみを対象としている[64-69]。実際にはぼけやノイズ、また圧縮などが画質の劣化に与える影響は非常に大きく、多くの劣化要因を画質評価に使用する指標としてカバーできることが望ましい。そこで本研究では画質の劣化

要因としてぼけとノイズを考慮した，NR 画質評価手法の提案を行う．ここでは RGB 画像ベースで手法の提案および評価を行うが，現行の WSI スキャナに対して画質評価を行うことも重要であることから，RGB 画像ベースの手法としても非常に価値があるといえる．

画質評価値は画像中から算出されたぼけおよびノイズに関するパラメータを用いて，回帰分析により求められた式を利用して計算される．WSI における圧縮技術の標準化などが不十分であることから，今回は圧縮による画質への影響については考慮しないものとする．

鮮鋭度評価

画像の鮮鋭度に基づいたぼけの定量化に関する様々な研究が報告されており，中でも多くの手法が画像中のエッジの広がりに基づく評価指標を定義している[65,66]．これらの手法は Sobel フィルタなどに代表される微分フィルタを利用したエッジ抽出を行っており，本研究では Canny エッジ検出器[70]を参照し Sobel フィルタを水平方向，垂直方向に適用することにより画像の回転に対しロバストな手法とする．撮影された画像は RGB 画像となるため，CIE XYZ 色空間の輝度 Y を利用することにより，各入力画像はグレースケール画像へと変換される．

ノイズの誤検出を防ぐためにまず入力画像に対して 2 次元ガウシアンフィルタ (3×3 画素， $\sigma = 0.5$) をかけ，その後 Sobel フィルタを水平垂直方向にかけることにより，ある画素における水平，垂直方向に対する輝度勾配 G_x および G_y を得る．このとき各画素における勾配強度と勾配方向はそれぞれ，

$$|G| = \sqrt{G_x^2 + G_y^2} \quad (5.1)$$

$$\theta = \arctan \left(\frac{|G_y|}{|G_x|} \right) \quad (5.2)$$

と計算され， θ の方向により各画素は図 5.1 のように $\theta_{\text{Label}} = 1, 2, \dots, 8$ としてラベリングされる．

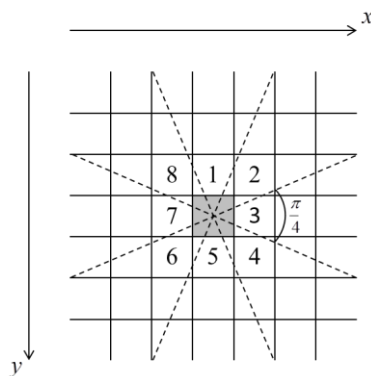


図 5.1 勾配方向のラベリング

さらに各エッジに関して細線化処理により勾配強度の極大値を算出し，設定したしきい値よりも大きければエッジ画素と見なす．エッジ検出のあと，各エッジにおける近傍の勾配強度の極大値と極小値の画素間の距離を算出し，それらを鮮鋭度評価値として使用する（図 5.2）．

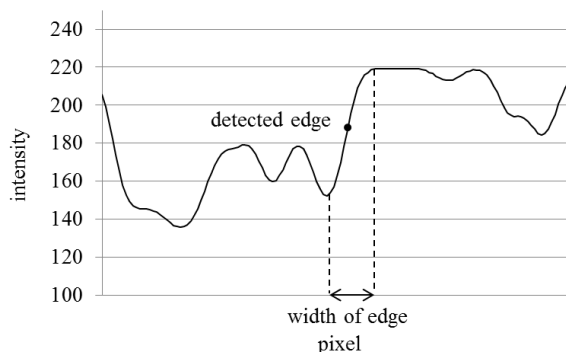


図 5.2 エッジ幅の算出方法

ここで各エッジにおけるエッジの幅 w はラベリングされた勾配方向 θ_{Label} によって以下のように修正される．

$$w_c = \begin{cases} w & \text{if } \theta_{\text{Label}} = 1, 3, 5, 7 \\ \sqrt{2}w & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5.3)$$

N 個のエッジをもつ画像の鮮鋭度評価値 s は次式，

$$s = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N w_c(i) \quad (5.4)$$

で表され， $w_c(i)$ は i 番目のエッジ画素におけるエッジの幅である．鮮鋭度評価値 s はエッジ 1 つあたりの平均のエッジ幅であり，この値が大きければぼけた画像，また小さいほどシャープな画像として評価される．

ノイズ評価

ノイズも画質の劣化に影響する重要な要因であることから，画質評価の際に考慮するためにノイズ定量化アルゴリズムを提案する．1 枚の画像のみからノイズを推定するアルゴリズムがいくつか提案されているが，多くの計算時間を要する[67,68]．本手法ではノイズが周囲の画素に依らずランダムに発生するという仮定に基づき，簡易なノイズ定量化手法を提案する．ノイズの定量化では，画像強調などに用いられるアンシャープマスク技術[71]を応用する．

まず入力画像にガウシアンフィルタをかけることでぼけた画像を取得し，このぼけた画像と元の入力画像との差分をもとめる．この結果，入力画像中のエッジもしくはノイズに

相当する画素のみが大きな値をもつ差分画像を得ることができる。これらのうちノイズのみを強調するために、差分画像の各画素について、その画素を中心とする 3×3 画素の小領域内における中心画素と各周囲画素との差分値を求める。計算された 8 画素に対する差分のうち最小となる差分値 d_{\min} をその中心画素における値とする (図 5.3 参照)。図 5.3 中の (a) はノイズ画素を、(b) はエッジ画素を示す。周囲との差分をとった際、エッジ画素に対応していた場合には、似たような値が周囲に存在しているため最小の差分値は 0 に近くなると予測され、一方でノイズの画素では最小差分値は比較的大きな値をとる。同様の処理を画像全体に対して行うことでノイズ画素の強調を行う。

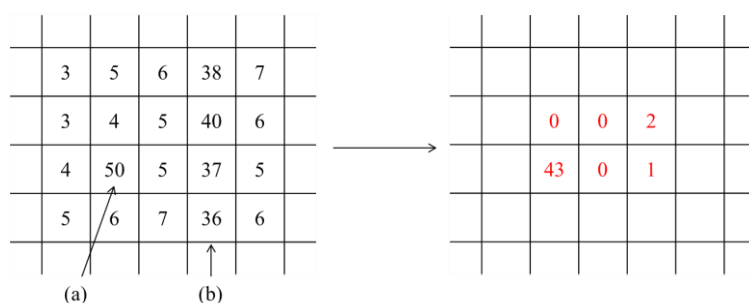


図 5.3 ノイズ強調処理の例

全画素に対して計算された最小差分値の二乗平均をとることでノイズ評価値 v を得る。

$$v = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M d_{\min}(j)^2 \quad (5.5)$$

M は画像の画素数であり、 $d_{\min}(j)$ は画素 j における上記の手法で求まる最小差分値である。ノイズは各チャンネルで独立に発生するものと仮定し、全てのチャンネルで同一の処理を行いそれらの平均値を最終的なノイズ評価値 v とする。画像に含まれるノイズが多いほどノイズ評価値 v は大きくなると予測される。

線形回帰モデル

最終的な画質評価値は上記の 2 つの評価値から求められる。従来手法における NR 画質評価においても線形モデルを利用した手法が提案されているため、ここでは次式の 1 次式モデルにより評価値 q の算出式を求める。

$$q = \alpha + \beta s + \gamma v \quad (5.6)$$

s および v は前述した鮮鋭度およびノイズに関する評価値であり、各係数 α 、 β および γ はトレーニングデータを用いた線形回帰分析により算出される。回帰分析に用いるトレーニングデータは画質評価の目的に応じて変更され、臨床応用を目的とした場合には主観評価指標を、また画像解析を目的とした場合には客観評価指標を用いる、といったように使い分けることによりユーザの要求に応じた画質評価値を得ることが可能となる。

5.3 実験

前節で提案した画質評価手法に対して妥当性を確認するために、客観評価指標および主観評価指標を利用した実験を行う。さらに WSI に対して画質評価アルゴリズムを適用することで、WSI スキャニングプロセスにおける実応用例を示し、有効性を確認する。

5.3.1 客観評価指標を用いた実験

画質評価手法の妥当性評価として、客観評価指標として MSE を用いた実験を行う。まずパラメータを変化させながら画像を劣化させたときの鮮鋭度評価値 s およびノイズ評価値 v と MSE の相関を確認した。ここでは NanoZoomer 2.0-HT (浜松ホトニクス社) によりスキャンされたマウスエンブリオ標本の WSI を実験に使用する (図 5.4)。画像は倍率 20 倍 ($0.46 \mu\text{m}/\text{pixel}$) で撮影され、クオリティファクターを 80 として JPEG 画像圧縮されたものである。エンブリオ標本は全ての臓器を有しているため、標本中の多くのサンプルを使用することで組織の違いによる結果の偏りをおさえることが可能となる。

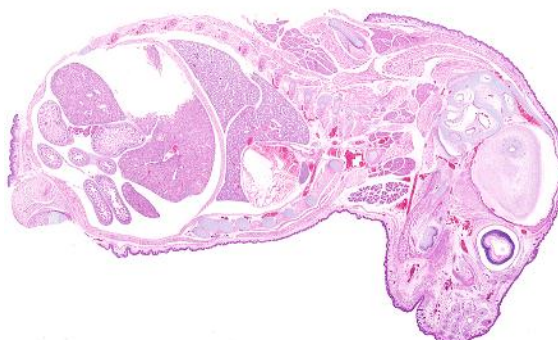


図 5.4 マウスエンブリオ標本

この WSI 中の様々な領域から手動で 20 点を指定し、各領域を 1200×800 画素のビットマップ画像として切り出した。これらの画像に対してガウシアンフィルタを適用することでぼけた画像を、またガウシアンノイズを付加することによりノイズがのった画像を生成した。また一部のスキャナでは自動で輪郭を強調するような処理を行うものも存在しており、極端に強調された画像は不自然なものとなるためここでは低画質な画像として扱い、アンシャープマスク処理を行うことにより生成した画像を劣化画像として使用した。ガウシアンフィルタの標準偏差をサンプリング間隔 0.2 として 0.2 から 2 まで、ガウシアンフィルタの標準偏差をサンプリング間隔 2 として 2 から 20 まで、またアンシャープマスクの係数をサンプリング間隔 0.2 として 0.2 から 2 まで変化させ、各画像に対して 30 枚の劣化画像 (3 種類 \times 10 パラメータ) を作製した。作製した劣化画像の例を図 5.5 に示す。提案した手法により各劣化画像に対する鮮鋭度評価値 s およびノイズ評価値 v 、また原画像との

MSE を算出しそれらの比較を行った。図 5.6 は各評価値と MSE の比較であり、各プロットが 1 つの劣化画像の評価値と MSE を示している。図 5.6(a)はぼけ画像における鮮鋭度評価値と MSE の関係、(b)はノイズ画像におけるノイズ評価値と MSE の関係、また(c)は鮮鋭化画像におけるノイズ評価値と MSE の関係をそれぞれ示し、各データにおけるピアソン相関係数はそれぞれ 0.861, 0.986, 0.971 となり高い相関が得られていることを確認した。

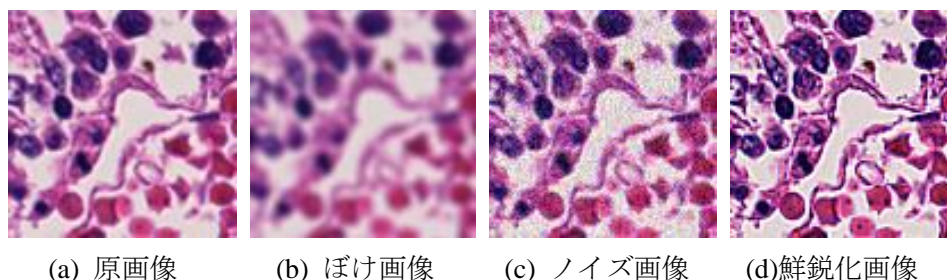
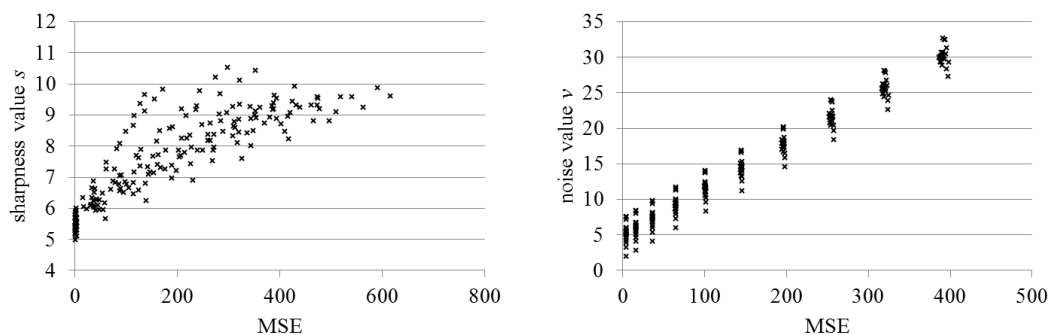
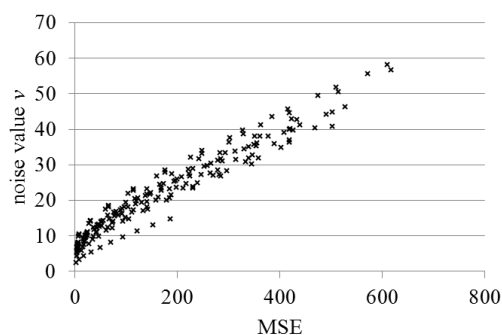


図 5.5 劣化画像のシミュレーション



(a) ぼけ画像における鮮鋭度評価値と MSE (b) ノイズ画像におけるノイズ評価値と MSE



(c) 鮮鋭化画像におけるノイズ評価値と MSE

図 5.6 各評価値と MSE の比較

前述の実験で指定した 20 点を含む 100 点の領域を同 WSI にて指定し、ビットマップ画像の切り出しを行った。先ほどと同様の処理を行い、シミュレーションにより劣化画像を

作製した。パラメータの設定については同じものを使用し、各画像について 30 枚の画像を生成し、合計 3000 枚の劣化画像を取得した。劣化画像のうちランダムに選ばれた 300 枚と原画像 100 枚をトレーニングデータとし、これらの画像に対して鮮鋭度評価値 s およびノイズ評価値 v 、原画像との MSE を計算し式(5.6)を用いた線形回帰分析により回帰係数 α 、 β および γ を算出した。なお原画像から計算される MSE は 0 となる。線形回帰分析を行った結果、予測式の各係数はそれぞれ $\alpha = -631$ 、 $\beta = 105$ 、 $\gamma = 15.1$ と求まり、自由度調整済み決定係数は $R^2 = 0.895$ 、標準誤差は 46.6 となった。図 5.7 はトレーニングデータを含む全画像から計算した画質評価値と MSE の比較であり、これらのデータ間におけるピアソン相関係数は 0.946 となっており非常に高い相関が得られている。以上の結果より、提案した画質評価アルゴリズムを用いることで MSE と同等の客観評価指標を参照画像なしで得ることが可能となり、画像解析において許容できるしきい値などを参照して画像の品質管理を行うことにより、信頼性の高い画像解析結果を得ることができる。

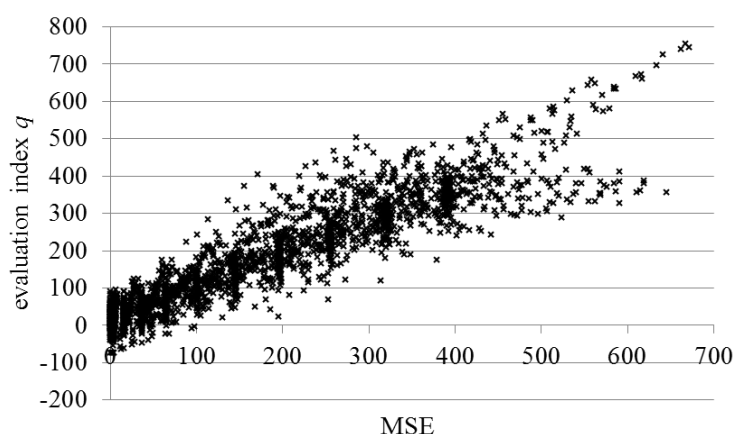


図 5.7 画質評価値と MSE の比較 (NanoZoomer 2.0-HT, 20 倍)

さらに撮影に使用するスキャナや撮影倍率を変更したときの画質評価結果への影響を調査した。MIRAX SCAN(3DHISTECH 社[72])を使用し、先ほど使用したものと同一マウスエンブリオ標本を倍率 20 倍($0.61 \mu\text{m}/\text{pixel}$)でスキャンした。前実験で指定した 100 点に含まれる 20 点の領域を指定することにより、同様に 1200×800 画素での切り出しを行い、各画像に対して 30 枚ずつ劣化画像を作製した。こうして生成された 600 枚の劣化画像を含む 620 枚全ての画像に対して、NanoZoomer 2.0-HT で撮影された画像により算出された回帰係数、すなわち $\alpha = -631$ 、 $\beta = 105$ 、 $\gamma = 15.1$ とした予測式を用いて画質評価値を計算した場合、MSE とのピアソン相関係数は 0.888 となった。このとき線形回帰分析のトレーニングデータを、MIRAX SCAN で撮影された画像から作製した劣化画像のうちランダムで選択された 300 枚に変更した場合においても、算出された画質評価値と MSE のピアソン相関係数は 0.892、また標準誤差は 62.6 となり、NanoZoomer 2.0-HT 撮影画像をトレーニングに使

用したときと近い結果が得られた。このときの画質評価値と MSE の関係を表すグラフを図 5.8 に示す。これらの結果より、入力機器の分解能が似ている場合、スキャナの種類の違いに依らず同様の結果が得られることがわかり、撮影倍率を同じにしたとき 1 つのトレーニングデータセットを利用することで、どのスキャナで撮影された画像においても同等の画質評価結果を得られる可能性を示した。

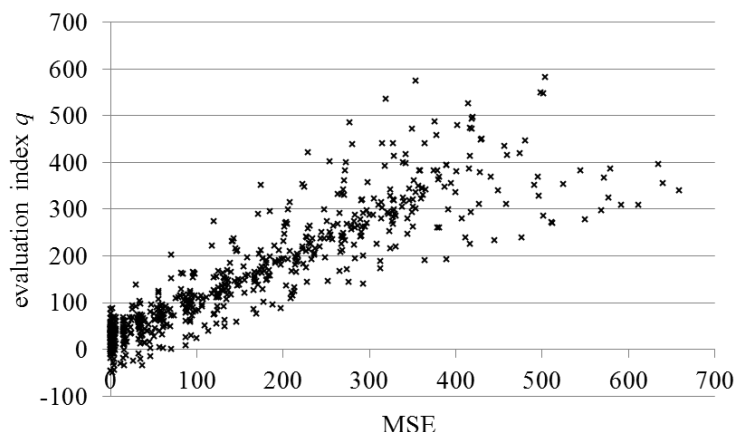


図 5.8 画質評価値と MSE の比較 (MIRAX SCAN, 20 倍)

次に、撮影倍率を変更されたときの画質評価結果に与える影響を調べる。これまでに使用したものと同一エンブリオ標本を NanoZoomer 2.0-HT により倍率 40 倍 ($0.23 \mu\text{m}/\text{pixel}$) で撮影した。前実験で指定したものに近い 20 点の領域を指定し、 1200×800 画素のビットマップ画像で切り出したのち、各画像に対して 30 枚の劣化画像を生成した。これらの劣化画像に対して、同スキャナで 20 倍撮影された画像により算出された回帰係数による予測式を用いて画質評価値を計算した場合、MSE とのピアソン相関係数は 0.507 となった。これは 40 倍で撮影したことによりエッジ幅が狭くなり、鮮鋭度評価値が大きく変化したこと起因すると思われる。そこで 40 倍で撮影された画像より作製した劣化画像のうちランダムに選択した 300 枚の画像を使用することにより、予測式を再計算した。新しいトレーニングデータを用いた線形回帰分析の結果、回帰係数はそれぞれ $\alpha = -264$ 、 $\beta = 35.5$ 、 $\gamma = 17.4$ と求まった。この係数を使用し 40 倍撮影された画像および劣化画像からなる 620 枚の画像に対して画質評価値を再び算出した結果、MSE とのピアソン相関係数は 0.965、また標準誤差は 25.1 となった。このときの画質評価値と MSE の関係を図 5.9 に示す。以上の結果より、撮影倍率を変更した場合分解能の変化により算出される評価値も変化することから、撮影する倍率に応じて適切なトレーニングデータを使用する必要があることが明らかになった。分解能が変化した場合、鮮鋭度評価値も線形に変化することが考えられるため、簡易なパラメータの修正により実験を行った。20 倍撮影画像をトレーニングデータとして算出された回帰係数 β を半分にして実験を行った結果、再計算された画質評価値と MSE と

のピアソン相関係数は 0.885 となり，もとの β を使用したときと比べて精度が大きく改善された．このときバイアス α は β および γ を固定した上で再び回帰分析を行うことで算出可能となる．倍率を変更するたびにトレーニングデータを変更することは汎用性の低下につながるため好ましくなく，今回のようなパラメータの修正により行えることが望ましい．

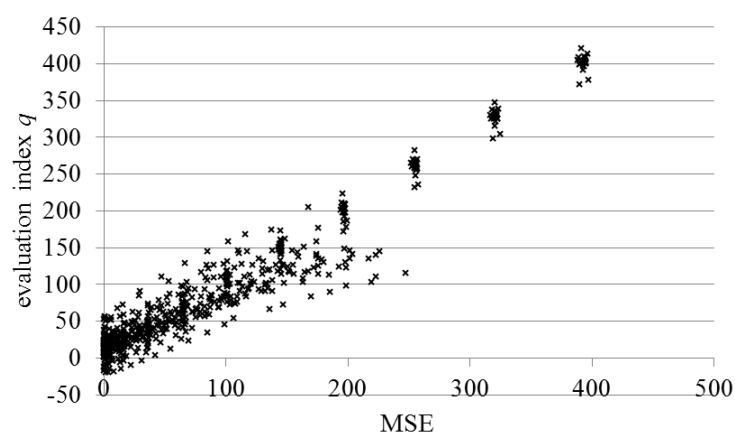


図 5.9 画質評価値と MSE の比較 (NanoZoomer 2.0-HT, 40 倍)

5.3.2 主観評価指標を用いた実験

臨床応用などを目的とした場合，主観に基づく画質の良し悪しも重要となるため，主観評価実験の結果をトレーニングデータとして用いた実験を行った．

回帰分析に用いる主観評価値を得るために簡易な画質評価アンケートをインターネット経由で実施した．回答者の内訳は病理医 4 人，その他の医師 2 人，検査技師 2 人，画像エンジニア 21 人，その他 3 人となる．指定されたアンケートサイトでは，開始時にいくつかの例を示しながら回答方法に関する説明を行い，図 5.10 に示すような主観評価実験の画面が表示され，様々な画像に対して主観的にスコアを与えていく．

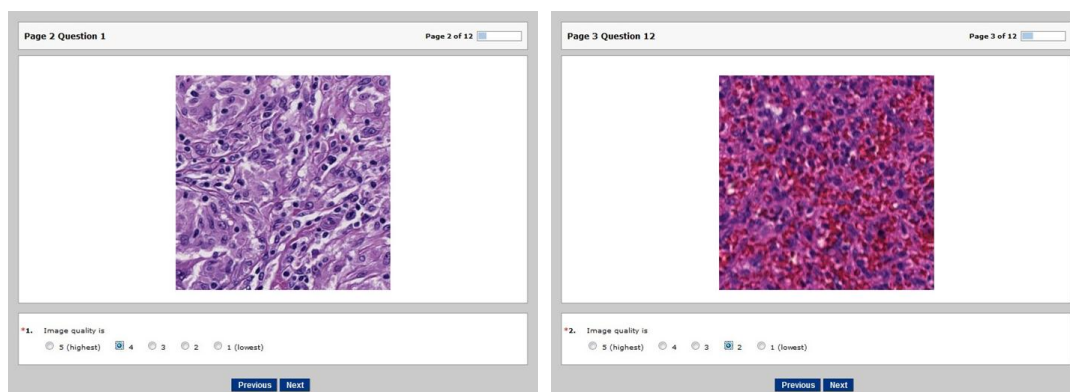


図 5.10 主観評価実験のスクリーンショット

NanoZoomer 2.0-HT によりスキャンされた肝臓や胸部といった様々な組織標本の WSI から 50 点の領域を指定し、 400×400 画素での切り出しを行った。このとき 25 枚の画像は主観的に高画質な、また残りの 25 枚は主にぼけにより劣化した低画質な領域を選択した。各画像は主観評価により 1 (低画質) から 5 (高画質) の 5 段階で評価された。それぞれの画像について主観評価値の分散を求め、全画像に対して平均の分散を計算した結果、0.619 となり主観評価の個人差は比較的小さいものとなった。各画像の主観評価値は全評価者により平均されたものを扱う。今回はランダムに選んだ半分の画像をトレーニングデータとし線形回帰分析を行い、残り半分をテストデータとして画質評価値を計算、元の主観評価値と比較することで手法の評価を行った。また客観評価値を用いた実験と比べてデータの数が少ないため、トレーニングデータをランダムに選び直し、同様の実験を全部で 10 回繰り返しながら、実験ごとにピアソン相関係数や標準誤差の算出を行った。10 回実験を行ったときの平均ピアソン相関係数は 0.874、相関係数の分散は 0.00098、また平均標準誤差は 0.471 となり、安定して高い相関が得られていることを確認した。鮮鋭度評価値およびノイズ評価値は画像中の情報を用いて客観的に算出した評価値であるものの、線形回帰分析に基づいた予測式を使用することで主観評価値と似た評価結果を得ることが可能となる。

また 4 人の病理医の主観評価結果のみを用いた場合の実験も行った。このとき 4 人の病理医によりつけられた主観評価値の平均分散は 0.527 となっている。上記と同様に 10 回の実験を行った結果、平均のピアソン相関係数は 0.839、また分散は 0.0013 となった。病理医のデータのみから予測式をたてた場合にも画質評価値と主観評価値の間に比較的高い相関が得られており、病理医が診断などに十分な評価値を示すことで、対象とする画像の画質が臨床応用において十分であるかどうかを判断できる可能性が考えられる。

5.3.3 WSI スキャナへの応用

5.3.1 節および 5.3.2 節では客観評価指標、主観評価指標を用いて画質評価アルゴリズムの妥当性を確認した。ここでは実システムにおける WSI スキャナへの画質評価手法の応用例を提案する。標本スキャンのプロセスにおいて撮影された画像中の低画質領域を検出することができれば、その領域のみを再スキャンして元の画像と統合することにより効率よく高画質な WSI を取得することが可能となる。WSI 全体をブロック分割し画質評価手法を適用し、低画質な画像ブロックの検出を行うことで実システム応用における実現可能性および手法の有効性を示す。図 5.11 に処理手順を示す。

今回は主観評価実験により得たスコアを利用するため、ブロックサイズを 400×400 画素とし WSI の分割を行う。分割された画像のうちほとんどの画素が白であればそのブロックは背景として無視される。今回は 8 ビット画像において画素値が 200 を超えるものを白色とし、白色画素がブロック中の 75% より多い場合、そのブロックを背景と見なした。ブロックが背景でなければ、ブロック画像から鮮鋭度評価値およびノイズ評価値を算出し画質評価値 q を求め、低画質なブロックの箇所を見やすくするため画質評価値 q に従い各プロ

ックの可視化を行う。今回の実験ではトレーニングデータとして、前実験で得た 50 枚全ての画像に対する主観評価値を用いて線形回帰分析を行い、回帰係数 $\alpha = -3.34$, $\beta = -0.214$, $\gamma = 0.3644$ を得た。図 5.12 はトレーニングデータに対する画質評価値と主観評価値の関係を示したものであり、このときのピアソン相関係数は 0.869 となっている。図中の○は高画質として選択した領域、△は低画質として選択した領域の評価値をそれぞれ表す。

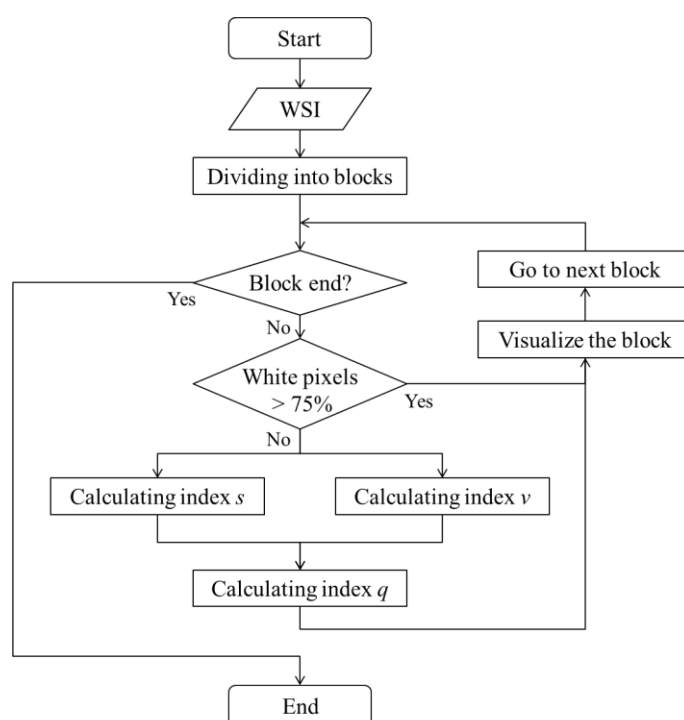


図 5.11 WSI への画質評価手法応用における処理手順

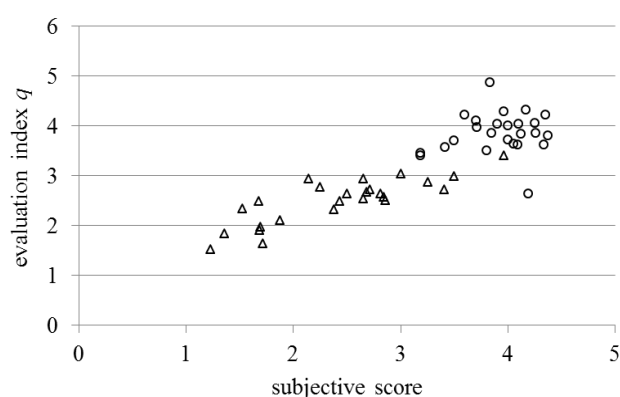


図 5.12 画質評価値と主観評価値の関係

以上の画質評価手法応用を図 5.13 に示すマウスエンブリオ標本の WSI に対して適用する。この標本は図 5.4 の標本の連続切片標本であり、NanoZoomer 2.0-HT のオートモードに

より 20 倍で撮影された。オートモードはスキャナが自動で標本中の複数の点を指定し、各点に対してオートフォーカスを行うことによりフォーカス位置の決定を行うモードである。指定されなかった点のフォーカス位置は周囲の指定された領域のフォーカス位置から補間により求められる。

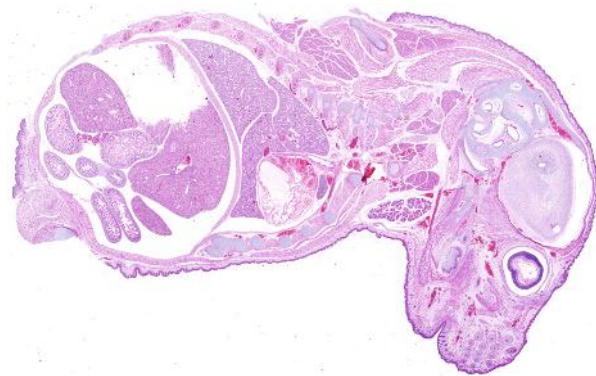
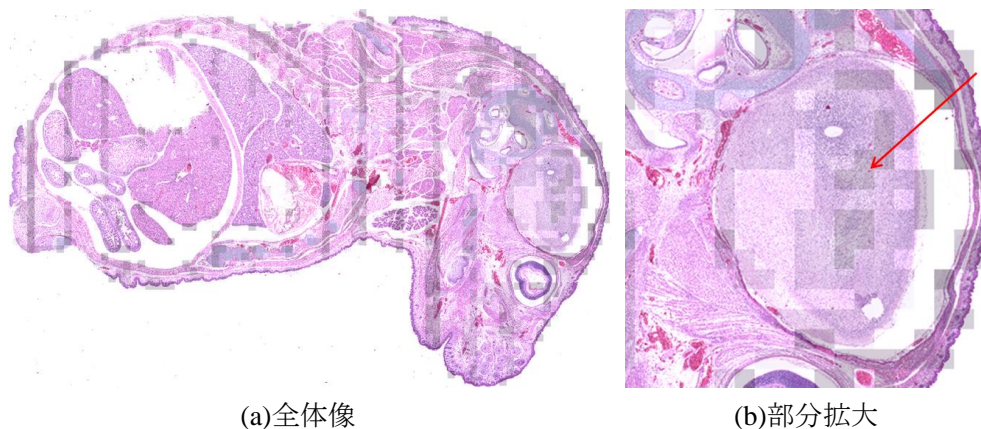


図 5.13 マウスエンブリオ標本 (図 5.4 の連続切片)

図 5.12 の主観評価値の分布から、高画質と判定するためのしきい値を $q=3.5$ とした。よって最終的なブロックの可視化では、画質評価値が 3.5 よりも大きくなったブロックを原画像と同じ明るさで表示し、そうでない場合には元の輝度よりも暗くした画像により表示を行う。例えばブロックの画質評価値が 3.5 から 3 の間の値をとる場合には原画像の $\frac{7}{8}$ の輝度値で、また 3 から 2.5 の間であった場合には $\frac{3}{4}$ の輝度値で表示する、といった可視化方法を適用する。なお最初の処理で背景と判定されたブロックは画質評価アルゴリズムを適用しないため元の明るさで表示される。図 5.14 にエンブリオ標本 WSI に対して画質評価手法を適用し評価値可視化を行った結果を示す。

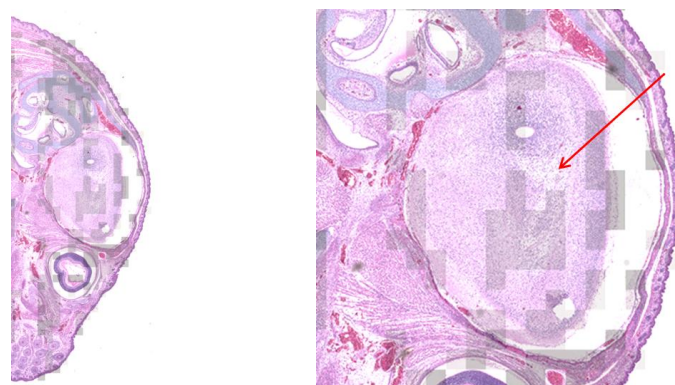


(a)全体像

(b)部分拡大

図 5.14 画質評価結果の可視化画像

原画像のサイズは 36000×24000 画素であり、5400 個に分割された 400×400 画素の各ブロックで画質評価を行い、その結果を上記の通り可視化しており、図中の明るい箇所は高画質、また暗い箇所は低画質と評価されたブロックをそれぞれ示している。多くのブロックが高画質として評価されており、画質評価値が 3 よりも大きいブロックは背景を除いたブロック全体のうち 85.6% を占める。しかし図 5.14(b) の矢印で示された箇所に代表されるように、いくつかの領域で低画質と評価されたブロックが見られた。特に今回の実験で使用した NanoZoomer 2.0-HT はラインスキャナであるため、ラインスキャナの幅に合わせて低画質と評価されたブロックが出現しており、これはラインセンサの端において中央よりも感度が悪いことが原因であると考えられる。矢印の箇所をフォーカスポイントとして手で指定し、オートフォーカスによりフォーカス位置を決定し同標本の再スキャンを行った。図 5.15 に再スキャンされた WSI のフォーカスポイント付近の画像を示す。



(a)フォーカスポイント周辺

(b)部分拡大

図 5.15 再スキャンされた画像に対する画質評価結果の可視化画像

画像からもわかるように、再スキャンされた領域は最初にスキャンされた画像と比べて画質評価値として改善されている。図 5.15(a) は再スキャンされた画像中の右側の 10000×24000 画素であるが、このうち最初にスキャンされた画像中で画質評価値が 3 未満であったブロックのうち、90.7% のブロックにおいて画質評価値が増加している。改善されたブロックの画質評価値の平均増加量は 0.434 となっており、5.2.3 で算出された標準誤差 0.471 と非常に近いことから、意味のある値となっている。このように画質評価手法を WSI 全体に対して適用することにより低画質の領域を検出することができれば、低画質と評価された領域のみを再スキャンし画像を統合することによって効率よく高画質な WSI を得ることが可能となる。

今回は最初のスキャンと再スキャンを別々の処理により実行しているためホワイトバランスのずれから明るさの違いが生じているが、実際にはスキャン中に画質評価アルゴリズムを実行し同条件下における再スキャンを行うことが期待されるため、同じ明るさの画像を得ることができる。また本実験では単純な処理により背景のみを評価の対象から除外し

たが、実際には WSI 中の観察などに必要な箇所は限られており、画像全体に対して画質が改善されるまで再スキャンを行うような処理は目的によっては非効率である。よって画像中の関心領域を決定する手法の検討も必要であり、現時点でも標本中のしわ検出などの開発が行われている[73]。また今後の課題としては圧縮による画質劣化を考慮したアルゴリズムも必要になると考えている。

本論文はマルチスペクトル WSI を最終的なシステムとして想定しているが、ここで提案した画質評価手法をマルチスペクトル画像へ適用することは比較的容易である。各波長の単バンドグレースケール画像についてそれぞれトレーニングデータを用意し画質評価アルゴリズムを適用することで各波長の画像ごとに画質評価結果を得ることができる。特にマルチスペクトル画像の場合、今回示した例であるフォーカスの問題に加えて、使用する波長帯域によってカメラ感度などの違いからノイズが増加することがあるため、画質評価値に基づき撮影環境の調整などを行い撮影画像の改善を行うといった実応用が考えられる。また RGB 画像の WSI においても画質評価の需要はあるため、今回提案した RGB 画像ベースの画質評価手法自体にも十分な価値がある。

5.4 第 5 章のまとめ

本章ではマルチスペクトル WSI の品質管理のための、参照画像を用いない画質評価手法の提案を行った。提案した画質評価アルゴリズムではぼけとノイズに対する評価値を画像から取得し、回帰分析によって得られた算出式により画質評価値を計算する。客観評価指標および主観評価指標を利用した実験により、各評価指標と提案した画質評価による評価値が高い相関をもつことを確認し手法の妥当性を示した。また WSI のスキャニングプロセスにおける実用を目的とした WSI 全体に対する画質評価手法の適用を行い、応用例の提示および手法の有効性を確認した。アルゴリズムの提案や実験は RGB 画像を用いたものであるが、マルチスペクトル WSI への応用は比較的容易に行うことができる。今後は圧縮などによる画質劣化も考慮したモデルについて検討していく必要がある。

第6章 マルチスペクトル WSI の作製

6.1 はじめに

本章では提案した画像解析技術を標本全体に対して適用するためのマルチスペクトル WSI の作製を行う。現行の WSI スキャナは RGB 画像のみを対象としておりマルチスペクトル画像入力に対応していないため、撮影システムを開発する必要がある。本章で提案するマルチスペクトル WSI 撮影システムは既存のマルチスペクトル顕微鏡システムを利用して開発され、16 バンド顕微鏡システムでは低倍率、また VariSpec を用いた顕微鏡システムでは加えて高倍率でのマルチスペクトル WSI の取得を可能とする。5 章で提案した画質評価手法のマルチスペクトル画像への応用方法についても検討を行い、最終的に開発した入力システムによって取得されるマルチスペクトル WSI に対して前章までに提案した画像解析技術を適用し、実システムが完成したときのインパクトを示す。

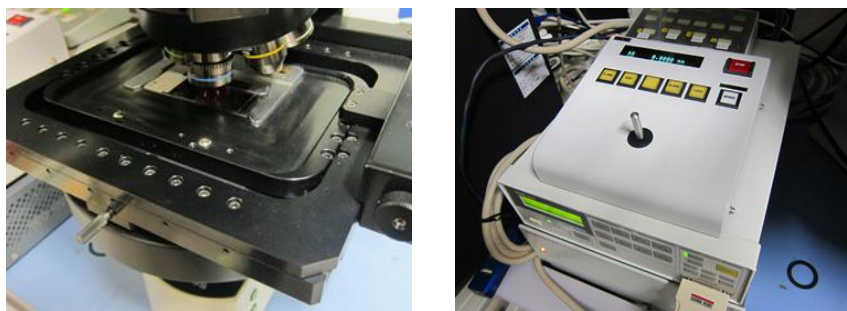
6.2 マルチスペクトル WSI 入力システムの開発

ここでは 16 バンドマルチスペクトル顕微鏡システムおよび VariSpec 顕微鏡システムを用いたマルチスペクトル WSI 入力システムを開発する。16 バンド顕微鏡システムでは低倍率の WSI 撮影を、また VariSpec 顕微鏡システムでは任意の倍率による WSI の撮影を可能とする。また実際に開発した撮影システムによりマルチスペクトル WSI の作製を行う。

6.2.1 低倍率マルチスペクトル WSI 撮影システム

16 バンドマルチスペクトル顕微鏡では CCD カメラの撮影とフィルタの回転を同期させるためイメージングソフトウェアが特別な仕様となっており、プログラムを実装することによる自動 XY ステージと回転フィルタ、CCD カメラの同時制御による自動タイリング撮影は困難となっている。そこで 16 バンド顕微鏡システムを用いた WSI 入力システムでは撮影時の制御を手動とし、対象を対物レンズ 2 倍や 4 倍といった低倍率のものに限定する。

16 バンドマルチスペクトル顕微鏡システムを用いて標本全体を走査しながら画像を撮影し、それらを画像処理でつなぎ合わせることで、1 枚の巨大なマルチスペクトル病理画像を作製する。撮影箇所は自動 XY ステージ(図 6.1)を手動制御することにより変更され、座標位置を確認しながら等間隔に撮影領域の移動を行う。



(a) 自動 XY ステージ

(b) 制御用コントローラ

図 6.1 自動 XY ステージ

実際に 3 章および 4 章で使用したものと同一の H&E 染色肝臓標本（図 6.2）を用いて、倍率 4 倍でのマルチスペクトル WSI 撮影を行う。標本のサイズは 2.5cm×2cm 程度となっており、目視で座標確認を行いながら自動 XY ステージを制御することで、画像内の感度ムラなどの影響を減らすために隣接する画像と 20% 程度の重複をもたせながら垂直方向に 7 枚、水平方向に 8 枚からなる計 56 枚の小領域画像を撮影した（図 6.3）。なお標本中の位置により最適なフォーカス位置がずれていることがあるため、領域移動を行う度にフォーカス位置の調整を行った。



図 6.2 撮影に使用した H&E 染色肝臓標本

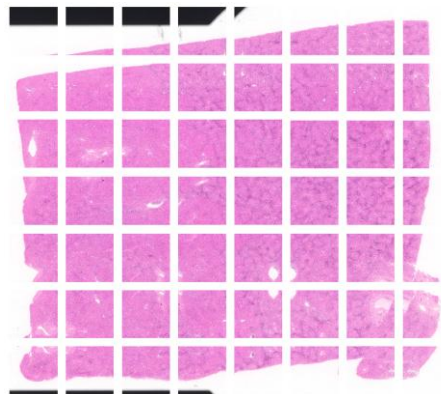


図 6.3 各領域で撮影されたマルチスペクトル画像

図 6.4 に示すように、撮影されたタイリング画像は正規化相互相関を利用したテンプレートマッチングにより対応点の算出を行ったのち、参照点を中心として各隣接画像と張り合わされる。なお正規化相互相関係数は式(4.13)で表され、ここでは信号値としてガラス画像を用いて算出された透過率を使用する。16 バンド画像は画像中の外側の感度が悪く、使用する波長帯域によっては組織間のコントラストが低くなるためマッチング精度が低下してしまい、バンドごとに対応点を算出し張り合わせを行うと大きな画素ずれが生じる可能性がある。よって低倍率 16 バンド画像の張り合わせの際には全バンドに対する正規化相互相関係数をそれぞれ求め、相関が最大となる波長帯域の結果を全バンド共通の対応点として採用する。

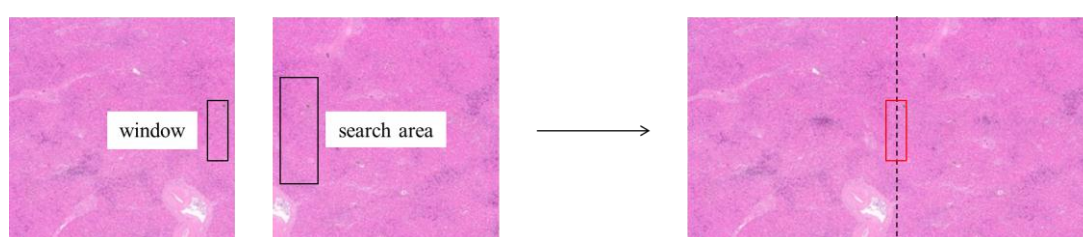


図 6.4 テンプレートマッチングを用いた張り合わせ

以上の処理によって作製したマルチスペクトル WSI を図 6.5 に示す。図 6.6 に境界付近の拡大図を示すが、色再現の段階ではフォーカスのずれや画素ずれなどによる明確な境界は見られず、概ね良好な画像の作製が行えたといえる。なお画像サイズは 13400×11781 画素となっており、透過率 0 から 1 を画素信号値 0 から 65535 に割り当てた 16 バンド透過率画像として RAW データ形式で保存された (ファイル容量 4.70GB)。



図 6.5 作製した低倍率マルチスペクトル WSI

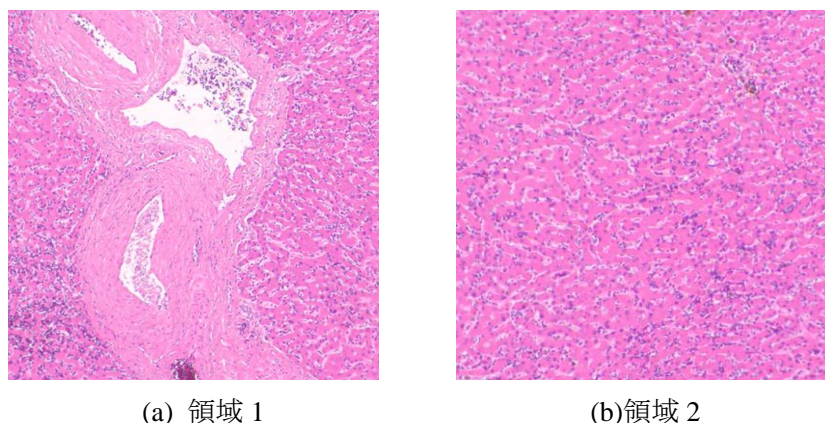


図 6.6 作製した低倍率マルチスペクトル WSI (部分拡大)

6.2.2 高倍率マルチスペクトル WSI 撮影システム

16バンドマルチスペクトル顕微鏡では自動撮影が行えなかったため、多くの撮影回数を必要とする高倍率のマルチスペクトル WSI の入力には困難であり、撮影対象を低倍率のみに限定していた。そこで液晶チューナブルフィルタ VariSpec を用いた顕微鏡システムによる高倍率マルチスペクトル WSI 撮影システムの開発を行った。

液晶チューナブルフィルタ VariSpec は外部機器との連携を行うことが比較的容易であることから、カメラと自動 XY ステージを同期させることによるマルチスペクトル画像のタイリング撮影が可能となる。カスタマイズされたイメージングソフトウェア Lumina Vision (三谷商事株式会社) を使用することにより、半自動的に画像の撮影を行う[74]。

病理組織標本では、同一標本内であっても各領域における厚みや組織分布の違いにより、適切なフォーカス位置が異なる可能性がある。このような標本を撮影する際に同じフォーカス位置で標本内のすべての領域を撮影した場合、フォーカス位置を決めた箇所から離れた領域において焦点ずれが生じることがある。このフォーカスの問題を解決するために、カスタマイズされたソフトウェアでは複数の領域で適切なフォーカス位置を決定し、それらの情報に基づきフォーカス近似曲面の計算を行う。

まず画像始点および終点の座標を入力、 400×300 画素程度の標本全体のサムネイル画像を取得し、図 6.7 に示すようにフォーカス位置を決めるための領域を自動もしくは修正があれば手動で指定する。指定された領域に対して焦点方向に対して任意のサンプリング幅で複数のスライス画像を撮影し、画像処理によって最も鮮鋭な画像となるフォーカス位置を最適なフォーカス位置として採用する。こうして取得された複数点のフォーカス位置から、補間により他の領域のフォーカス位置を求め、近似曲面の計算を行う。最終的にカメラの撮影範囲と指定した標本の撮影範囲から、スキャンの際の撮影座標を決定し、各座標に合わせたフォーカス位置を割り当てたスキャンパターンファイルを出力する。作成されたスキャンパターンを読み込むことで、自動タイリング画像撮影を行う。なおタイリングの際には重複画素の指定を行うことが可能であり、重複をもたせない場合には隣接画像同

士をそのまま張り合わせ，また重複領域をもたせた場合には前節で説明したようにパターンマッチングなどを利用した画像張り合わせを行う．しかしながら4章でも述べたように波長ごとの画素ずれなども存在することから，重複をもたせて撮影，張り合わせを行った方が正確なスペクトルデータの取得が期待される．

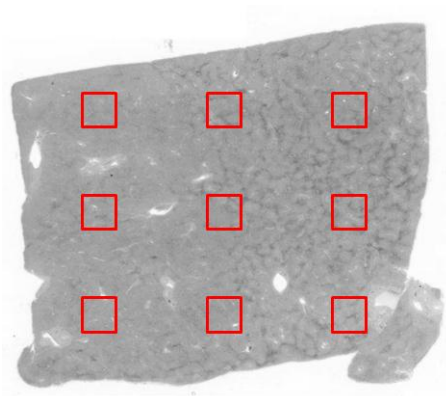
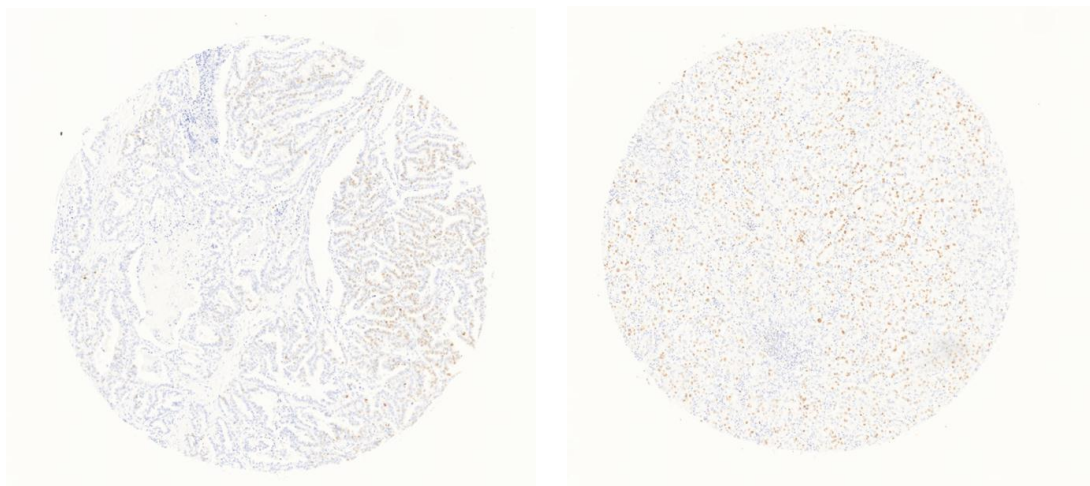


図 6.7 サムネイルを用いたフォーカス決定領域の指定

上記のシステムにより実際に高倍率マルチスペクトル WSI の撮影を行った．今回は図 6.8 に示す Ki-67 染色肝臓 TMA 標本 (SRL 社) を使用し 2 箇所 (コア) の円形領域 (コア) について撮影した．各コアのサイズは $2\text{mm} \times 2\text{mm}$ 程度となっており，隣接画像間の重なりを 0 として撮影し， 1344×1024 画素の画像を水平方向に 5 枚，垂直方向に 6 枚の計 30 枚撮影することによりコア全体の画像を取得した．取得された各画像はプログラムにより結合され，1 枚のコア全体の画像として出力される．対物レンズを 20 倍とし， $410\text{-}710\text{nm}$ を 10nm 間隔で撮影することにより 31 バンドのコア画像の作製を行った．色再現された 6720×6144 画素からなるコア画像を図 6.9 に示す．使用したコアはそれぞれ，図 6.9(a)が胆管細胞癌 (Grade2)，(b)が胆管細胞癌 (Grade3) となっている．



図 6.8 撮影に使用した肝臓 TMA 標本

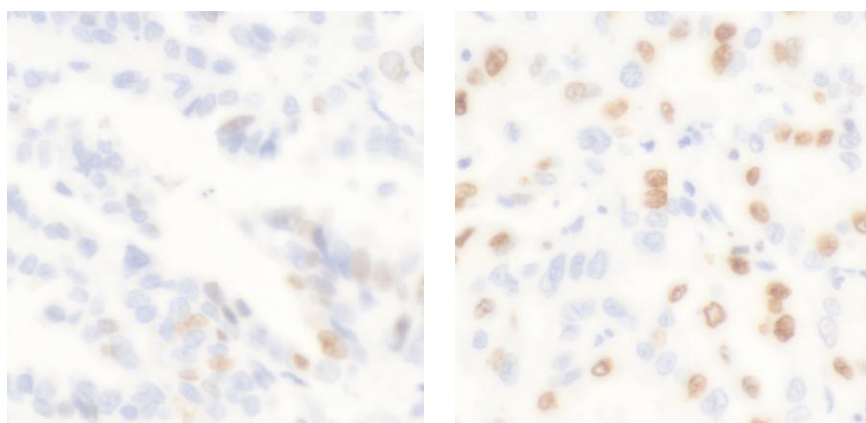


(a) 胆管細胞癌(Grade2)

(b) 胆管細胞癌(Grade3)

図 6.9 作製した高倍率マルチスペクトル WSI

図 6.10 の拡大図からもわかるように、隣接画像間の境界部分において若干のずれが確認された。これはカメラの水平方向とステージの水平方向が一致していないことや各方向への移動距離が正確にキャリブレーションできていないためであると考えられ、これらを改善することによりずれは低減することが可能である。しかしながらカメラの水平方向とステージの水平方向を画素単位で一致させることは非常に困難であることから、重なりをもたせて撮影を行いマッチングなどによる張り合わせも検討していく必要がある。



(a) 胆管細胞癌(Grade2)

(b) 胆管細胞癌(Grade3)

図 6.10 作製した高倍率マルチスペクトル WSI (部分拡大)

今回は TMA 標本中のコアを対象として画像の取得を行ったが、より大きいサイズの組織標本を撮影することももちろん可能である。しかしながら高倍率での撮影の場合、撮影されたマルチスペクトル WSI の容量が問題となる。今回の撮影では小領域の全体画像を取

得しているため作製されたマルチスペクトル WSI のファイルサイズは約 2.5GB となっていたが、例として前節と同様の組織標本を撮影倍率 20 倍、31 バンドで撮影し 16bit で保存した場合、単純計算で 200GB 以上ものファイル容量となる。さらに 40 倍で撮影を行った場合には 1TB 近くのファイルサイズとなる。RAW データ形式での扱いはファイルサイズの観点からも現実的ではなく、マルチスペクトル WSI に適した圧縮技術および圧縮画像に対応した専用フォーマットなどの開発が不可欠となる。マルチスペクトル画像の圧縮については現在研究が進んでおり [75-77]、中では病理画像を対象とした圧縮に関する検討も行われている [78]。

6.3 マルチスペクトル画像への画質評価手法応用

第 5 章では RGB 画像をベースとした画質評価手法の提案を行い、実験により有効性を確認した。同評価手法をマルチスペクトル画像用に拡張し入力システムに組み込むことで、効率よく高品質なマルチスペクトル WSI の取得が可能となると考えられる。

マルチスペクトル画像への画質評価手法の適用方法として、各波長画像に対して処理を適用する方法を考える。実験として単波長画像に対して画質評価手法を適用し第 5 章と同様に効果的な評価結果が得られることを確認するため、今回は 550nm を対象として同波長で撮影されたトレーニングデータおよびテストデータを用いて実験を行った。トレーニングデータとして 5 章で使用したマウスエンブリオ標本の連続切片中の様々な臓器から 20 箇所を選択し 20 倍撮影を行い、分光透過率に変換することにより 550nm に対する 1344×1024 画素の 8bit グレースケール画像を得た。5.3.1 の実験と同じパラメータを用いてぼけ画像、ノイズ画像、鮮鋭化画像の 3 種類の画像を 10 段階でシミュレーションし、20 枚の撮影領域に対して合計 600 枚の劣化画像を生成した。原画像を含む 620 枚の画像から MSE をそれぞれ算出し、式(5.6)に基づいた線形回帰分析により回帰係数 α 、 β および γ を求めた。なお単波長画像における画質評価アルゴリズムでは、グレースケールの輝度値を 5 章に記載したそれぞれの計算式に使用する。このとき予測式の各係数はそれぞれ $\alpha = -141$ 、 $\beta = 14.7$ 、 $\gamma = 10.9$ と求まり、トレーニングデータにおける MSE と画質評価値 q との間のピアソン相関係数は 0.795、標準誤差は 56.1 となった。

上で求めた予測式を利用して、テストデータの評価を行う。テストデータには図 6.8 に示した肝臓 TMA 標本のうち H&E 標本の中から、6.2 節で選択したコアである胆管細胞癌(Grade2)を指定し、550nm に対する全体画像を撮影した(図 6.11)。6.2.2 で記述したフォーカス近似曲面を利用した場合とフォーカス位置をある z 座標で固定した場合の 2 通りのコア画像を撮影し、それぞれに対して画質評価アルゴリズムを適用し結果の比較を行った。作製された 550nm に対する WSI は 6720×6144 画素であり、画質評価を適用するブロックのサイズはトレーニングデータの画像サイズに合わせて 1344×1024 画素とした。

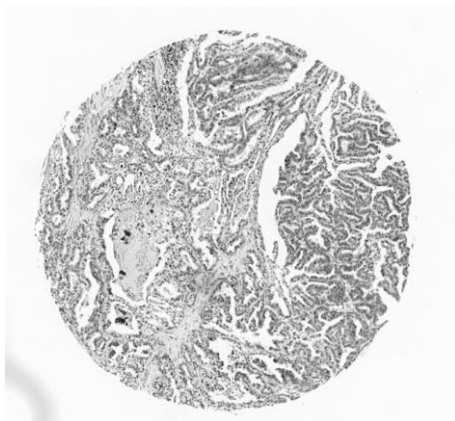


図 6.11 作製した高倍率マルチスペクトル WSI (550nm, フォーカス曲面使用)

評価結果より有効なブロック数は 18 個となり, フォーカスを固定した場合に比べてフォーカス近似曲面を採用した場合には画像全体での平均の画質評価値 q は 2.40 減少した. 回帰分析の目的変数として MSE を使用していることから画質評価値は MSE と似た意味を持っており, フォーカス近似曲面を採用することにより画質は向上していることになる. 回帰分析の標準誤差に比べて画質評価値の向上が小さいため今回得られた効果はわずかなものであるが, これは使用している画像のサイズが小さいことが原因であると考えられる. 実際に鮮鋭度評価値 s のみを比較すると, フォーカス位置を固定した場合に比べてフォーカス近似曲面を使用した場合では鮮鋭度評価値が 0.173 減少しており, よりシャープな画像として認識されている. より大きなサイズの標本を使用した場合には最適なフォーカス位置が大きく異なる領域が存在することが予測され, そのようなケースには画質評価値の大幅な向上が期待される. フォーカス近似曲面を使用することは各ブロックで最適なフォーカス位置を決定することと等しく, フォーカス位置を固定した場合に対して画質が向上したと評価されることは妥当である. 以上より, 単波長画像をトレーニングデータとして使用することで, 対応した波長画像の画質評価を行えることを確認した.

今回の実験のように, マルチスペクトル画像では照明ムラなどを除去するために分光透過率空間で画質評価を行う. RGB 画像を使用していた場合ではホワイトバランスの違いなどによって異なる画質評価結果が得られる可能性があったが, 透過率を使用することにより信号値のレンジに関する問題を解決することができる. また本論文で提案している画質評価アルゴリズムではエッジ部分の幅のみを鮮鋭度評価に用いているため, ある波長に対して異なる波長のトレーニングデータを使用した場合においても同等の精度で画質評価が行える可能性がある. 実システム応用を考慮した場合, 全ての波長に対する画像をトレーニングデータとして用意することは汎用性の低下につながってしまうため, トレーニングデータの取得をできるだけ簡易にすることが望まれる. 今後, 異なる波長や異なる染色方法の画像をトレーニングデータとして用いた際の画質評価結果への影響などを確認し, 手法のロバスト性を高めていく必要がある.

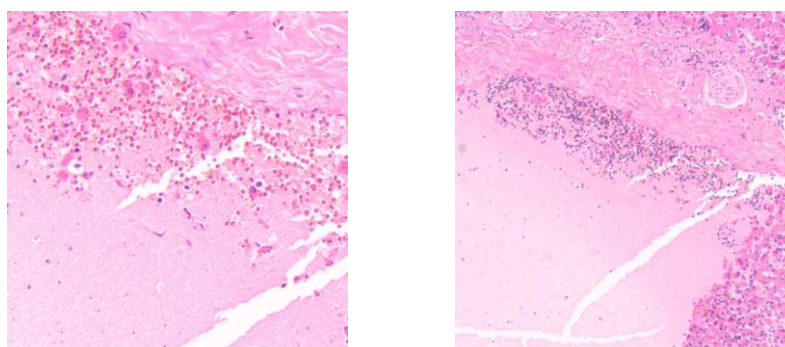
6.4 標本全体への画像解析手法適用

6.2 節で作製したマルチスペクトル WSI に対して提案した画像解析手法の適用を行う。ここでは低倍率マルチスペクトル WSI に 3 章で提案した画像色強調を、また高倍率マルチスペクトル WSI に 4 章で提案したデジタル染色手法を適用する。

6.4.1 マルチスペクトル画像色強調の適用

病理標本全体に対して画像解析手法を適用した結果を確認するために、6.2.1 で作製した低倍率の WSI に 3 章で提案した色強調手法を適用する。標本全体に処理を適用することによって、実際にシステムが完成したときのインパクトを示すことが期待される。

今回の実験を行うにあたって、撮影倍率を変更することにより透過率が変化している可能性があるため、マルチスペクトル WSI の作製に使用した小領域画像の中からサンプル透過率を取得し、KL 基底を再び算出した。図 6.12 からもわかるように、撮影倍率を変更した場合の赤血球の色に違いがあることがわかる。これは組織の大きさと撮影システムの分解能の関係によるものと考えられ、スペクトルとして見たときも異なる形をしていることが予測される。そこで透過率データは細胞質、細胞核、赤血球、ガラスについて各組織から 2×2 画素の ROI により 100 点ずつ取得、特に赤血球に関しては色が濃いものと薄いものの 2 種類から 100 点ずつを取得し、計 500 点のデータから共分散行列を作成し KL 基底ベクトルの計算を行った。今回は基底に使用した組織の種類を増やしたため、主成分の表現に必要な基底の本数も増加すると考え、 $m=8$ とした。このときの各組織の平均透過率から算出した残差成分を図 6.13 に示す。残差成分の比較より、3 章で行った実験と同様に線維領域が 8 バンド目に大きな残差成分をもつことが確認できる。



(a) 10 倍撮影画像

(b) 4 倍撮影画像

図 6.12 H&E 染色標本中における赤血球領域画像

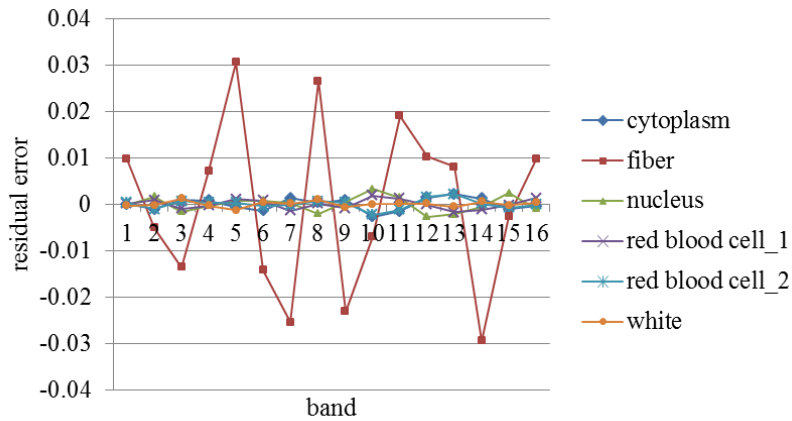


図 6.13 H&E 染色標本中における各組織の残差成分（第 8 基底まで使用）

$n=8$ としたときの提案手法 I による色強調結果を図 6.14 に示す. なお使用した重み係数行列は, 3.3.1 で行った実験における提案手法 I と同様のものを使用している.

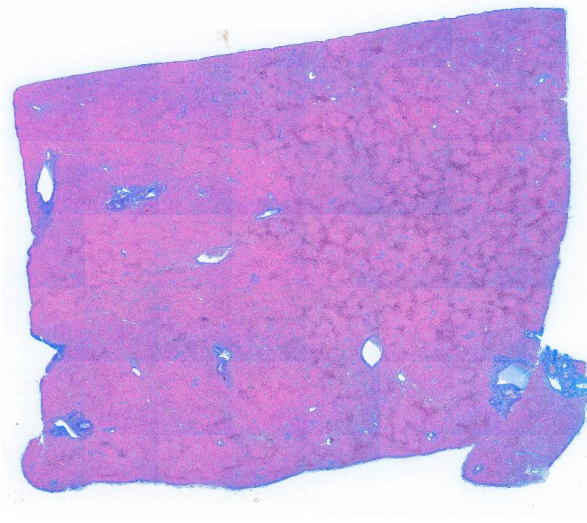


図 6.14 低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果（提案手法 I）

結果から, 標本全体に対して色強調処理を適用した場合においても, 線維領域が MT 染色標本の線維の色で強調されていることが確認できる. 例えば, H&E 標本の組織構造を観察する上で重要となる門脈域は画像中において白色で表示されているが, その周囲に線維領域を含んでいるため, 実システムにおいてこのような色強調を行うことによって低倍率でも門脈域の位置を容易に認識することが可能となる. 色強調はスペクトル特徴の可視化を主の目的としているが, 既知のスペクトル特徴を利用した診断支援への応用も期待される. また 2 種類の赤血球を基底算出の際に使用することにより, 図 6.15 に示すように赤血

球領域における色の変化を低減できていることが確認できる。しかしながら図 6.16 からわかるように、張り合わせの境界部分において色強調結果にずれが生じていることが確認された。色再現の段階では色のずれは確認できないが、色強調結果においてエラーが生じていることから隣接画像間において同領域のスペクトルデータに差異があることがわかる。この問題は低倍撮影を行うことにより画像外側の感度が悪く、隣接画像間において同じスペクトルデータが取得できなかったことが問題とされる。重複領域を増やし、画像中のさらに中心の画素のみを張り合わせに使用するか、6.2.2 で述べた入力システムにより高倍率で撮影することによって改善できる可能性がある。

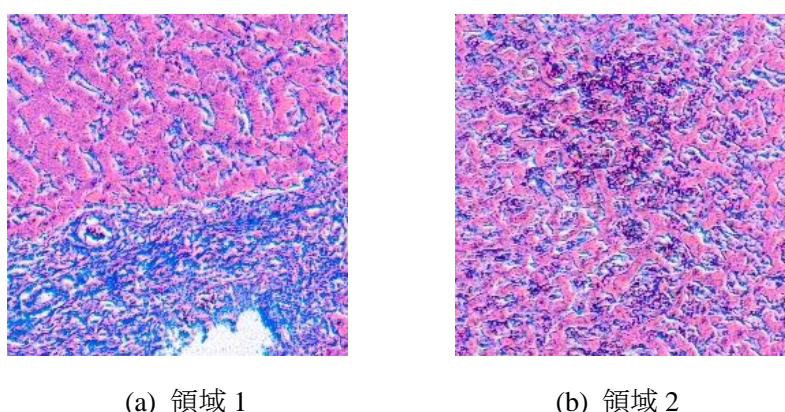


図 6.15 低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果（部分拡大）

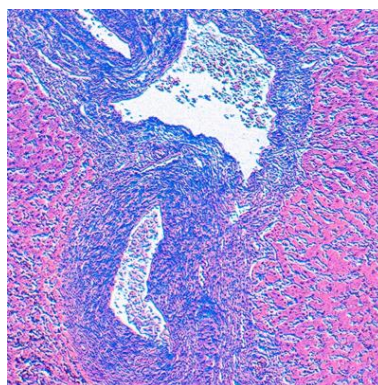


図 6.16 低倍率マルチスペクトル WSI に対する色強調結果（境界部分）

今回は低倍率マルチスペクトル WSI のみに画像解析手法を適用したが、前章までの画像解析結果と併せて見ることにより、20 倍で撮影されたマルチスペクトル WSI に処理を適用した際にも、標本全体に対して同様の処理結果を確認できると予測される。

6.4.2 デジタル染色の適用

4.2.2 で説明したように、高倍率マルチスペクトル WSI に使用した Ki-67 染色標本は陽性

の核を観察するために使われる染色手法であり，細胞質や正常な核などといった他の組織はヘマトキシリンにより染色される．そのため Ki-67 染色標本では細胞の構造などを観察することは困難であり，参照標本として連続切片の H&E 染色標本を同時に観察するのが一般的である．しかしながら連続切片の標本は若干異なった組織構造である場合や，対応する組織が見つからない場合がある．さらに標本によっては隣あった連続切片のスライドを作製できない場合も存在し，そのような場合には対象の Ki-67 染色標本と大きく異なる構造をもつ H&E 染色標本しか観察することができない．そこで Ki-67 染色標本に対してデジタル H&E 染色を適用することで細胞質などの観察が容易になれば，同一の組織構造をもつ H&E 染色標本を参照画像として観察することが可能となる．こうした実応用を目的として，ここでは 6.2.2 で作製した高倍率マルチスペクトル WSI に対してデジタル染色を適用する．

Ki-67 染色標本へのデジタル H&E 染色応用では，細胞質，細胞核，陽性核（図 6.17）の 3 種類の組織を対象として成分係数推定を行い，吸光度の復元を行う．つまり成分係数推定時における Ki-67 染色標本の吸光度モデルは次式で表される．

$$a_{\text{Ki-67}}(\lambda) = C_{\text{Hcyto}}\varepsilon_{\text{Hcyto}}(\lambda) + C_{\text{Hnuc}}\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda) + C_{\text{DAB}}\varepsilon_{\text{DAB}}(\lambda) \quad (6.1)$$

ここで $\varepsilon_{\text{DAB}}(\lambda)$ は Ki-67 染色標本中の陽性核から取得した吸収係数，また C_{DAB} はそれに対する成分係数である．このモデルに従い非負制約付き成分係数推定を行い，推定された成分係数 \hat{C}_{Hcyto} ， \hat{C}_{Hnuc} および \hat{C}_{DAB} を用いて復元されるデジタル H&E 染色画像の吸光度モデルは，

$$\hat{a}_{\text{HE}}(\lambda) = w_{\text{cyto}}\hat{C}_{\text{Hcyto}}\varepsilon_{\text{HEcyto}}(\lambda) + w_{\text{nuc}}\hat{C}_{\text{Hnuc}}\varepsilon_{\text{HEnuc}}(\lambda) + w_{\text{DAB}}\hat{C}_{\text{DAB}}\varepsilon_{\text{DAB}}(\lambda) \quad (6.2)$$

と表される．この式は細胞核の色を実際の H&E 染色標本の色へ近づけ，また陽性核の色をもとの色で保持する場合のモデルとなる．ユーザの要求に応じて $\varepsilon_{\text{HEnuc}}(\lambda)$ を $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$ で置き換えることにより細胞核の色を純粋なヘマトキシリンで表現，また $\varepsilon_{\text{DAB}}(\lambda)$ を $\varepsilon_{\text{HEnuc}}(\lambda)$ で置き換えることにより全ての核を同じ色とした H&E 染色標本と近い画像を得ることが可能となる．実験では $\varepsilon_{\text{HEcyto}}(\lambda)$ および $\varepsilon_{\text{HEnuc}}(\lambda)$ は図 6.18 に示す連続切片の H&E 染色 TMA 標本から取得された．

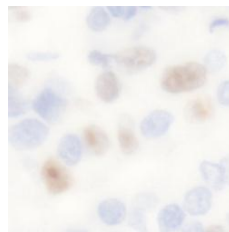


図 6.17 Ki-67 染色標本における陽性細胞核（褐色）

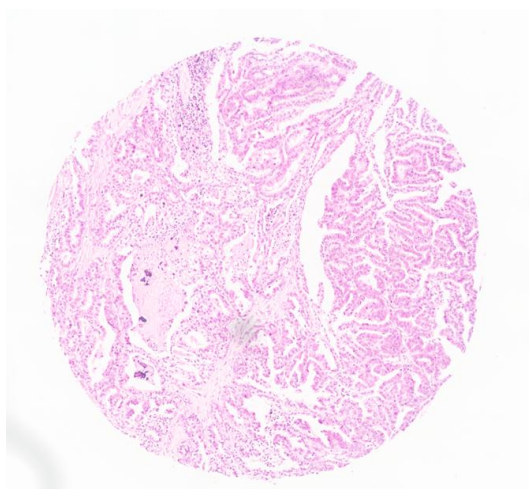


図 6.18 作製した高倍率マルチスペクトル WSI (H&E 染色)

上記のアルゴリズムに従い、図 6.9(a)に示した胆管細胞癌(Grade2)の Ki-67 染色標本に対してデジタル H&E 染色を適用した. 実験的に得た重み係数 $w_{\text{cyto}} = 6$, $w_{\text{nuc}} = 5$, $w_{\text{DAB}} = 2$ を使用した場合のデジタル染色結果を図 6.19 に示す. 結果より, 空白部分がうすいエオジンの色に変化しているが, 図 6.18 に示した H&E 染色標本と比較しても近い画像が得られていることを確認できる. Ki-67 染色標本では細胞質におけるヘマトキシリンの染色がうすく吸光度が非常に小さいため, 空白領域においても細胞質に対応した成分係数 \hat{C}_{Hcyto} が推定されることが色の変化の原因となっている. また結果の部分拡大図を図 6.20 に示す.

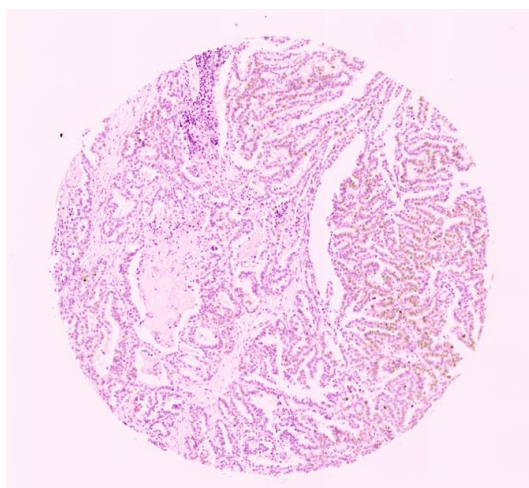


図 6.19 デジタル H&E 染色画像(胆管細胞癌 Grade2)

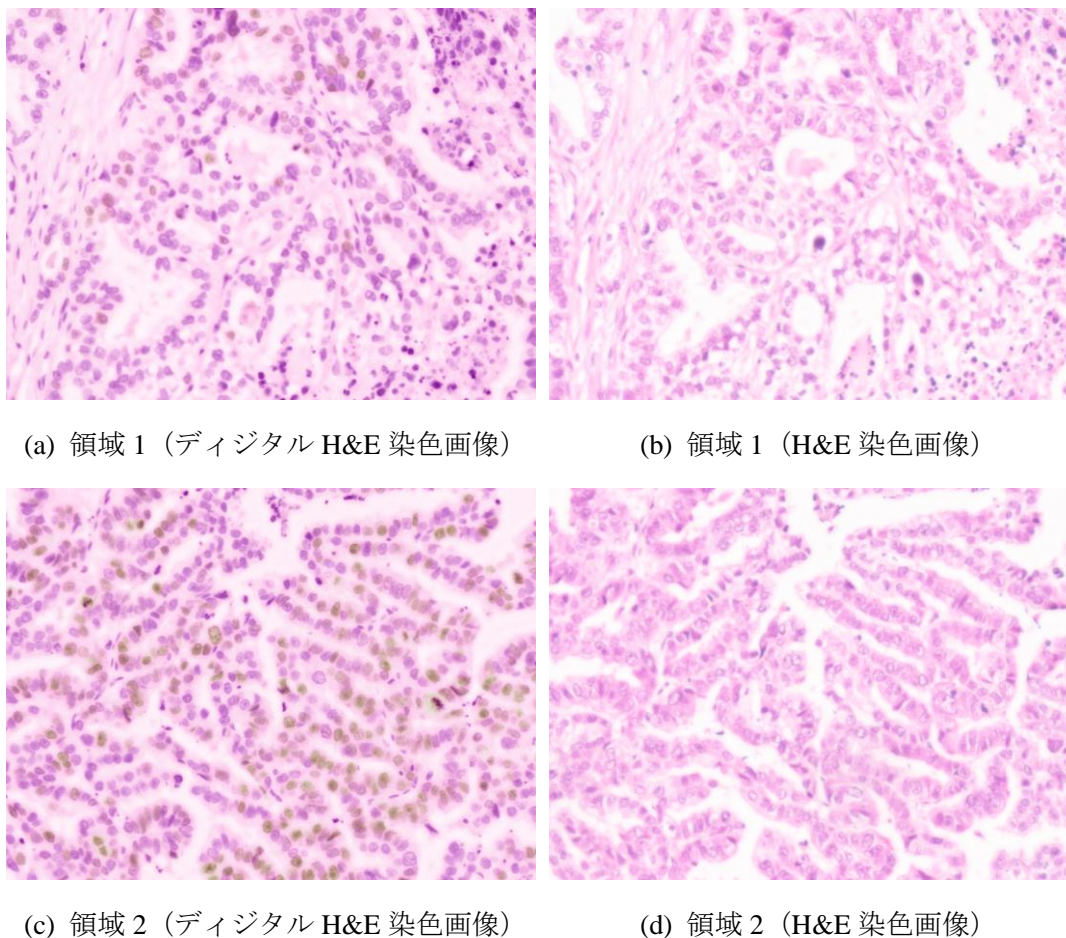
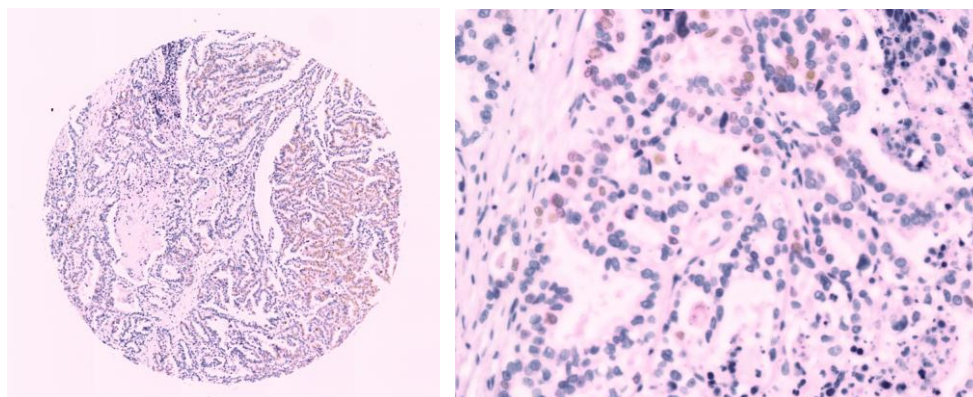


図 6.20 デジタル H&E 染色画像(部分拡大)

有識者からの意見として、「かなり近い画像が得られているが、細胞質のエオジンの色を濃く（細胞質と空白領域のコントラストを高く）できるとよい」「細胞核の色はヘマトキシリンの色を残した方が見やすい」とコメントをいただいた。

先述のように細胞質と空白領域の吸光度のレベルが近いことから空白領域の色が変わってしまう問題があるため、処理の改善を行う必要があると考えられる。また細胞核の色に関して、復元の際に $\varepsilon_{\text{HEnuc}}(\lambda)$ を $\varepsilon_{\text{Hnuc}}(\lambda)$ に置き換えた結果を図 6.21 に示す。H&E 染色画像と比較すると細胞核の色が大きく異なるが、細胞質とのコントラストがより高くなるため細胞核の観察を行いやすく、ユーザの要求に応じて使い分けることも可能である。精度の向上により参照画像応用としての実現可能性が高まるため、今後手法の改善が期待される。



(a) 全体像

(b) 部分拡大図

図 6.21 デジタル H&E 染色画像(細胞核をヘマトキシリンで表現)

6.5 第 6 章のまとめ

本章では、マルチスペクトル WSI 撮影システムの開発を行い、第 5 章で提案した画質評価手法の応用検討を行った。実際にシステムによって取得された低倍率マルチスペクトル WSI に対して第 3 章で提案した色強調手法を、高倍率マルチスペクトル WSI に対して第 4 章で提案したデジタル染色手法を適用することで、それらの有効性を確認した。低倍率マルチスペクトル WSI を用いた実験では一部の箇所において正しいスペクトルデータが取得できておらず、張り合わせ境界部分において異なる色強調結果が得られた。高倍率マルチスペクトル WSI を使用した実験では境界部分において処理結果の違いは生じていなかったため、高倍率での入力システムの方がより高精度なスペクトルデータを取得できることが確認できた。今後より高効率・高精度なマルチスペクトル WSI を得るためのシステムの改善が期待される。

第7章 結論

本論文では、病理標本全体をデジタル画像化する WSI にマルチスペクトル画像を応用するための画像解析技術の提案を行った。

第2章では、病理分野の現状としてデジタル化の必要性、近年開発されている WSI 技術について説明した。また現行のマルチスペクトルイメージングやマルチスペクトル画像の病理分野応用について本研究室の先行研究を含めて紹介を行った。さらにこれらを組み合わせたマルチスペクトル WSI システムについての概要、技術の必要性について述べ、本研究の位置づけを説明した。

第3章ではマルチスペクトル色強調技術に関する検討を行い、効果的な可視化を行うために、色強調に使用するための行列に関して新たな設計手法の提案を行った。提案手法では強調する波長帯域と表示に使用する色をそれぞれ任意に指定することにより、従来手法よりも効果的な可視化を可能とし、さらに強調結果を表示する際に使用するスペクトルの決定方法についても代表的な手法の提案を行った。実験では病理画像や皮膚画像といった従来手法が適用されていた画像に加えて、一般的にマルチスペクトル画像が利用されているリモートセンシング画像を使用することにより、提案手法の有効性を確認した。さらに高速アルゴリズムの開発を行い、実行時間の比較を行うことで優位性を示した。

第4章ではデジタル染色技術に関する検討を行った。本研究では色素量推定手法に基づいたデジタル染色アルゴリズムの開発を行い、H 単染色標本画像からデジタル H&E 染色画像を行った。さらに同様のアプローチを用いてデジタル MT 染色画像の作製を行い、線維領域の占有率に基づく定量的評価を行った。定量評価の結果より精度が不十分であるため、今後の処理の改善が望まれる。特に赤血球領域のフチにおいてエラーが目立ったため、空間情報などを用いた処理の改善が期待される。また IHC 染色標本へのデジタル H&E 染色手法の応用について提案を行った。

第5章ではマルチスペクトル WSI 入力システムの検討の一部として、撮影された画像の品質管理のための参照画像を用いない画質評価手法の提案を行い、客観評価指標および主観評価指標を利用した実験により手法の妥当性を確認した。また WSI スキャニングプロセスにおける実用を目的とした WSI 全体に対する画質評価手法の適用を行い、応用例の提示および手法の有効性を確認した。

第6章では、マルチスペクトル WSI 撮影システムの開発を行った。16 バンド顕微鏡システムを利用した低倍率撮影システム、また液晶可変フィルタを用いた顕微鏡システムによる高倍率撮影システムの開発を行い、実際に取得された低倍率マルチスペクトル WSI

に対して色強調手法を、高倍率マルチスペクトル WSI に対してデジタル染色手法を適用することで提案技術の有効性を確認した。また画質評価手法をマルチスペクトル画像に適用する方法についても検討を行っており、単波長画像を用いた実験によって妥当な画質評価結果を確認した。

マルチスペクトル WSI システムにはまだ多くの課題が残されている。

入力システムでは撮影時間がかかることに加え、画像容量の大きさが問題となる。今回開発したシステムで 30 バンドのマルチスペクトル WSI を撮影し、16bit 画像で保存を行った場合、従来の RGB の WSI に比べて容量が単純計算で 20 倍に増加する。このような問題を解決するためにマルチスペクトル画像の圧縮に関する研究が行われているが、現時点では目標となる必要な画質が定まっていないことも問題となっている。また圧縮とは別にシステム構成検討の一部として保存方式の検討も行われている。保存方式に関して、将来的には標準化に向けた専用画像フォーマットの開発なども必要になると考えられる。

本研究で提案した画像解析技術に関しても、ビューアへ実装した際の処理時間の削減が不可欠となる。本論文で高速化アルゴリズムを開発したマルチスペクトル画像色強調を対象とした場合には影響は少ないが、デジタル染色のような非線形の演算を含む画像解析を行う場合には処理時間が多くなることが問題となる。今後、実装を想定した画像解析技術に関してアルゴリズムの高速化などが期待される。

画質評価を用いた品質管理に関しては、今回の実験では一度撮影された画像に対して画質評価アルゴリズムを適用し、低画質と評価された画素にフォーカスを合わせて再度スキャンを行うことにより画質の改善を実現した。しかしながら実際には高速なスキャンを行いたいため、スキャニングプロセスに画質評価アルゴリズムを組み込み、スキャン中にすでに撮影された箇所に関して画質評価を行うシステムが理想とされる。

以上に述べたような課題をクリアし、マルチスペクトル WSI システムが実装され、高度な病理診断および診断支援が実現されることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜った本学 大山永昭教授, 山口雅浩教授に心から感謝いたします。また, 本学 小尾高史准教授, 鈴木裕之助教, 村上百合研究員, 木村文一研究員, 石川雅浩研究員, **Sercan Taha Ahi** 研究員, 埼玉医科大学 篠田一馬研究員には, 研究全般にわたり多くのご助言とご協力をいただいたこと, 深く感謝いたします。

本学 羽鳥好律教授, 長橋宏教授, オリンプス株式会社 菊池奨氏には論文審査の場において貴重なご意見やご質問をいただきました。厚く御礼申し上げます。論文審査に加え, グローバル COE メンター制度, ハイパースペクトル画像に関する研究資料のご提供とご助言をいただきました本学 小杉幸夫教授には深く感謝いたします。

半年間の留学を受けいれてくださったマサチューセッツ総合病院 八木由香子氏には留学中の研究に関して多くのご助言をいただき, また研究以外の面においてもお世話になりました。厚く御礼申し上げます。留学時の研究や論文執筆に際し多くのご助言, ご協力をいただきました同病院 **Pinky Abarca Bautista** 研究員に心より感謝いたします。

慶應義塾大学 坂元亨宇教授, 橋口明典助教には本研究に関して病理医としての立場から数々の有益なご意見をいただきましたことを感謝いたします。本学 宇都有昭助教にはハイパースペクトル画像の撮影協力, また画像の提供を行っていただきました。深く感謝いたします。

数々の事務手続きなどでお世話になり研究室での生活を支えてくださった研究室秘書の黒田京香さん, 大川みのりさんに厚く御礼申し上げます。大山・小尾研究室ならびに山口研究室の皆様には, 研究に関する議論や協力のみでなく, 共に楽しい研究生生活を過ごせたことに心より感謝しております。

また本研究の一部は, 日本学術振興会グローバル COE プログラム“フォトニクス集積コアエレクトロニクス”, および独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構の助成を得て行われました。有益なご援助に感謝いたします。

最後に, 修学に際し日々支えてくださった両親に心から感謝いたします。

参考文献

- [1] 向井清, “病理診断の標準化と精度管理,” *医学のあゆみ*, Vol. 176, No. 10, pp. 683–686, 1996.
- [2] 向井清, “病理診断と精度管理,” *Skin Cancer*, Vol. 10, No. 1, 1995.
- [3] E. Ruijter, G. van Leenders, G. Miller, F. Debruyne, and C. van de Kaa, “Errors in histological grading by prostatic needle biopsy specimens: frequency and predisposing factors,” *Journal of Pathology*, Vol. 192, No. 2, pp. 229–233, Oct. 2000.
- [4] W.C. Allsbrook Jr., K.A. Mangold, M.H. Johnson, R.B. Lane, C.G. Lane, and J.I. Epstein, “Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: General pathologists,” *Human Pathology*, Vol. 32, No. 1, pp. 81–88, Jan. 2001.
- [5] M. Ladekar, “Objective malignancy grading: A review emphasizing unbiased stereology applied to breast tumors,” *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Vol. 106, No. 79, pp. 5–34, May 1998.
- [6] M.N. Gurcan, L.E. Boucheron, A. Can, A. Madabhushi, N.M. Rajpoot, and B. Yener, “Histopathological image analysis: A review,” *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, Vol. 2, pp. 147–171, Oct. 2009.
- [7] P. Corr, I. Couper, S.J. Beningfield, and M. Mars, “A simple telemedicine system using a digital camera,” *Journal of Telemedicine and Telecare*, Vol. 6, No. 4, pp. 233–236, Aug. 2000.
- [8] C.C.H. Tse, “Anatomic pathology image capture using a consumer-type digital camera,” *American Journal of Surgical Pathology*, Vol. 23, No. 12, pp. 1555–1558, Dec. 1999.
- [9] J.R. Gilbertson, J. Jo, L. Anthony, D.M. Jukic, Y. Yagi, and A.V. Parwani, “Primary histologic diagnosis using automated whole slide imaging: a validation study,” *BioMed Central Clinical Pathology*, Vol. 6, No. 4, Apr. 2006.
- [10] J. Ho, A.V. Parwani, D.M. Jukic, Y. Yagi, L. Anthony, and J.R. Gilbertson, “Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: design and pilot validation studies,” *Human Pathology*, Vol. 37, No. 3, pp. 322–331, Mar. 2006.
- [11] M.G. Rojo, G.B. Garcia, C.P. Mateos, J.G. Garcia, and M.C. Vicente, “Critical comparison of 31 commercially available digital slide systems in pathology,” *International Journal of Surgical Pathology*, Vol. 14, No. 4, pp. 285–305, Oct. 2006.
- [12] R.S. Weinstein, A.R. Graham, L.C. Richter, G.P. Barker, E.A. Krupinski, A.M. Lopez, K.A. Erps, A.K. Bhattacharyya, Y. Yagi, and J.R. Gilbertson, “Overview of telepathology, virtual

- microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future,” *Human Pathology*, Vol. 40, No. 8, pp. 1057–1069, Aug. 2009.
- [13] Aperio Technologies, Inc. <http://www.aperio.com/>
- [14] 浜松ホトニクス株式会社 <http://jp.hamamatsu.com/>
- [15] J. Diamond, N.H. Anderson, P.H. Bartels, R. Montironi, and P.W. Hamilton, “The use of morphological characteristics and texture analysis in the identification of tissue composition in prostatic neoplasia,” *Human Pathology*, Vol. 35, No. 9, pp. 1121–1131, Sept. 2004.
- [16] O. Sertel, J. Kong, H. Shimada, U.V. Catalyurek, J.H. Saltz, and M.N. Gurcan, “Computer-aided prognosis of neuroblastoma on whole-slide images: Classification of stromal development,” *Pattern Recognition*, Vol. 42, No. 6, pp. 1093–1103, Jun. 2009.
- [17] V. Roullier, V.-T. Ta, O. Lézoray, and A. Elmoataz, “Graph-based multi-resolution segmentation of histological whole slide images,” *Proc. IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2010)*, pp. 153–156, Apr. 2010.
- [18] Aurora Interactive Ltd. <http://www.auroramsc.com/>
- [19] Leica SlidePath ホームページ
<http://www.leica-microsystems.com/products/digital-pathology/>
- [20] F. Melgani, and L. Bruzzone, “Classification of hyperspectral remote sensing images with support vector machines,” *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 42, No. 8, pp. 1778–1790, Aug. 2004.
- [21] J.M.P. Nascimento, and J.M.B. Dias, “Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data,” *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 43, No. 4, pp. 898–910, Apr. 2005.
- [22] Y. Zhong, L. Zhang, B. Huang, and P. Li, “An unsupervised artificial immune classifier for multi/hyperspectral remote sensing imagery,” *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 44, No. 2, pp. 420–431, Feb. 2006.
- [23] M. Yamaguchi, H. Haneishi, and N. Ohyama, “Beyond red-green-blue (RGB): Spectrum-based color imaging technology,” *Journal of Imaging Science and Technology*, Vol. 52, No. 1, pp. 010201-1–010201-15, Jan. 2008.
- [24] J.Y. Hardeberg, F. Schmitt, and H. Brettel, “Multispectral color image capture using a liquid crystal tunable filter,” *Optical Engineering*, Vol. 41, No. 10, pp. 2532–2548, Oct. 2002.
- [25] R.S. Berns, F.H. Imai, P.D. Burns, and D.-Y. Tzeng, “Multi-spectral-based color reproduction research at the Munsell Color Science Laboratory,” *Proc. SPIE*, Vol. 3409, pp. 14–25, May 1998.
- [26] D. Scribner, P. Warren, and J. Schuler, “Extending color vision methods to bands beyond the visible,” *Proc. IEEE Workshop on Computer Vision Beyond the Visible Spectrum (CVBVS 1999)*, pp. 33–40, Jun. 1999.

- [27] D.A. Socolinsky, and L.B. Wolff, "Multispectral image visualization through first-order fusion," *IEEE Transaction on Image Processing*, Vol. 11, No. 8, pp. 923–931, Aug. 2002.
- [28] N.P. Jacobson, and M.R. Gupta, "Design goals and solution for display of hyperspectral images," *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 43, No. 11, pp. 2684–2692, Nov. 2005.
- [29] M. Yamaguchi, T. Teraji, K. Ohsawa, T. Uchiyama, H. Motomura, Y. Murakami, and N. Ohya, "Color image reproduction based on the multispectral and multiprimary imaging: Experimental evaluation," *Proc. SPIE*, Vol. 4663, pp. 15–26, Jan. 2002.
- [30] K. Ohsawa, T. Ajito, H. Fukuda, Y. Komiya, H. Haneishi, M. Yamaguchi, and N. Ohya, "Six-band HDTV camera system for spectrum-based color reproduction," *Journal of Imaging Science and Technology*, Vol. 48, No. 2, pp. 85–92, Mar./Apr. 2004.
- [31] Caliper Life Sciencem, Inc. <http://www.caliperls.com/>
- [32] Specim Imaging Ltd. <http://www.specim.fi/>
- [33] P.A. Bautista, T. Abe, M. Yamaguchi, Y. Yagi, and N. Ohya, "Digital staining for multispectral images of pathological tissue specimens based on combined classification of spectral transmittance," *Computerized Medical Imaging and Graphics*, Vol. 29, No. 8, pp. 649–657, Dec. 2005.
- [34] R.M. Levenson, "Spectral imaging perspective on cytomics," *Cytometry*, Vol. 69A, No. 7, pp. 592–600, Jul. 2006.
- [35] R.M. Levenson, and J.R. Mansfield, "Multispectral imaging in biology and medicine: Slices of life," *Cytometry*, Vol. 69A, No. 8, pp. 748–758, Aug. 2006.
- [36] A. Rabinovich, S. Agarwal, C.A. Laris, J.H. Price, and S. Belongie, "Unsupervised color decomposition of histologically stained tissue samples," *Proc. Neural Information Processing Systems (NIPS 2003)*, pp. 667–674, Dec. 2003.
- [37] K. Fujii, M. Yamaguchi, N. Ohya, and K. Mukai, "Development of support systems for pathology using spectral transmittance - The quantification method of stain conditions," *Proc. SPIE*, Vol. 4684, pp.1516–1523, Feb. 2002.
- [38] 阿部時也, 村上百合, 山口雅浩, 大山永昭, 八木由香子, "マルチスペクトル画像を用いた病理画像の色素量の定量化と色標準化: バンド数と計算精度の検討," *Medical Imaging Technology*, Vol. 24, No. 1, pp. 38–47, Jan. 2006.
- [39] T. Abe, Y. Murakami, M. Yamaguchi, N. Ohya, and Y. Yagi, "Color correction of pathological images based on dye amount quantification," *Optical Review*, Vol. 12, No. 4, pp. 293–300, Aug. 2005.
- [40] 田代充良, 村上百合, 山口雅浩, 小尾高史, 大山永昭, 阿部時也, 八木由香子, "マルチスペクトル病理画像に基づく染色濃度調整処理の実装方法に関する検討," *Medical Imaging Technology*, Vol. 26, No. 4, pp. 240–245, Sept. 2008.

- [41] M. Mitsui, Y. Murakami, T. Obi, M. Yamaguchi, and N. Ohyama, "Color Enhancement in multispectral image using the Karhunen-Loeve transform," *Optical Review*, Vol. 12, No. 2, pp. 69–75, Apr. 2005.
- [42] A.B. Kahle, D.P. Madura, and J.M. Soha, "Middle infrared multispectral aircraft scanner data: Analysis for geological applications," *Applied Optics*, Vol. 19, No. 14, pp. 2279–2290, Jul. 1980.
- [43] A.R. Gillespie, A.B. Kahle, and R.E. Walker, "Color enhancement of highly correlated images. I. Decorrelation and HSI contrast stretches," *Remote Sensing of Environment*, Vol. 20, No. 3, pp. 209–235, Dec. 1986.
- [44] J. Ward, V. Magnotta, N.C. Andreasen, W. Ooteman, P. Nopoulos, and R. Pierson, "Color enhancement of multispectral MR images: Improving the visualization of subcortical structures," *Journal of Computer Assisted Tomography*, Vol. 25, No. 6, pp. 942–949, Nov./Dec. 2001.
- [45] P.A. Bautista, T. Abe, M. Yamaguchi, and N. Ohyama, "Multispectral image enhancement for H&E stained pathological tissue specimens," *Proc. SPIE*, Vol. 6918, 691836, Mar. 2008.
- [46] 村上百合, "分光反射率の推定理論," 日本写真学会誌, Vol. 65, No. 4, pp. 234–239, Aug. 2002.
- [47] N. Kosaka, K. Uto, and Y. Kosugi, "ICA-aided mixed-pixel analysis of hyperspectral data in agricultural land," *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 2, No. 2, pp. 220–224, Apr. 2005.
- [48] A.R. Huete, "A soil-adjusted vegetation index (SAVI)," *Remote Sensing of Environment*, Vol. 25, No. 3, pp. 295–309, Aug. 1988.
- [49] B.-C. Gao, "NDWI - A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space," *Remote Sensing of Environment*, Vol. 53, No. 3, pp. 257–266, Dec. 1996.
- [50] S. Itano, T. Akiyama, H. Ishida, T. Okubo, and N. Watanabe, "Spectral characteristics of aboveground biomass, plant coverage, and plant height in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) meadows," *Grassland Science*, Vol. 46, No. 1, pp. 1–9, Apr. 2000.
- [51] 小杉幸夫, "ナラ枯れのハイパースペクトル・リモートセンシングの可能性を探る," 日本森林学会大会学術講演集, Vol. 119, Mar. 2008.
- [52] K.L. Castro-Esau, G.A. Sánchez-Azofeifa, and T. Caelli, "Discrimination of lianas and trees with leaf-level hyperspectral data," *Remote Sensing of Environment*, Vol. 90, No. 3, pp. 353–372, Apr. 2004.
- [53] M.L. Clark, D.A. Roberts, and D.B. Clark, "Hyperspectral discrimination of tropical rain forest tree species at leaf to crown scales," *Remote Sensing of Environment*, Vol. 96, No. 3–4, pp. 375–98, Jun. 2005.

- [54] C. Vaiphasa, S. Ongsomwang, T. Vaiphasa, and A.K. Skidmore, "Tropical mangrove species discrimination using hyperspectral data: A laboratory study," *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 65, No. 1–2, pp. 371–379, Oct. 2005.
- [55] 吉田理恵, "病理画像におけるスペクトル特徴の解析に関する検討," 修士学位論文, 東京工業大学, 2011.
- [56] 宮澤知克, "スペクトル情報を用いた病理画像からの組織分類に関する研究," 修士学位論文, 東京工業大学, 2009.
- [57] W.M. Becker, J. Hardin, L.J. Kleinsmith, "細胞の世界," 村松正実, 木南凌訳, 西村書店, 2005.
- [58] H.A. Lehr, T.W. Jacobs, H. Yaziji, S.J. Schnitt, and A.M. Gown, "Quantitative evaluation of HER-2/neu status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization and by immunohistochemistry with image analysis," *American Journal of Clinical Pathology*, Vol. 115, No. 6, pp. 814–822, Jun. 2001.
- [59] E. Rexhepaj, D.J. Brennan, P. Holloway, E.W. Kay, A.H. McCann, G. Landberg, M.J. Duffy, K. Jirstrom, and W.M. Gallagher, "Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: Application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer," *Breast Cancer Research*, Vol. 10, No. 5, R89, Oct. 2008.
- [60] V.J. Tuominen, S. Ruotoistenmäki, A. Viitanen, M. Jumppanen, and J. Isola, "ImmunoRatio: A publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone (PR), and Ki-67," *Breast Cancer Research*, Vol. 12, No. 4, R56, Jul. 2010.
- [61] A.M. Eskicioglu, and P.S. Fisher, "Image quality measures and their performance," *IEEE Transaction on Communications*, Vol. 43, No. 12, pp. 2959–2965, Dec. 1995.
- [62] Z. Wang, and A.C. Bovik, "A universal image quality index," *IEEE Signal Processing Letters*, Vol. 9, No. 3, pp. 81–84, Mar. 2002.
- [63] Z. Wang, A.C. Bovik, H.R. Sheikh, and E.P. Simoncelli, "Image quality assessment: From error visibility to structural similarity," *IEEE Transaction on Image Processing*, Vol. 13, No. 4, pp. 600–612, Apr. 2004.
- [64] X. Li, "Blind image quality assessment," *Proc. IEEE International Conference on Image Processing (ICIP 2002)*, pp. I-449–I-452, Sept. 2002.
- [65] P. Marziliano, F. Dufaux, S. Winkler, and T. Ebrahimi, "A no-reference perceptual blur metric," *Proc. IEEE International Conference on Image Processing (ICIP 2002)*, pp. III-57–III-60, Sept. 2002.
- [66] E. Ong, W. Lin, Z. Lu, X. Yang, S. Yao, F. Pan, L. Jiang, and F. Moschetti, "A no-reference quality metric for measuring image blur," *Proc. IEEE International Symposium on Signal Processing and Its Applications*, pp. 469–472, Jul. 2003.

- [67] K. Konstantinides, B. Natarajan, and G.S. Yovanof, "Noise estimation and filtering using block-based singular value decomposition," *IEEE Transactions on Image Processing*, Vol. 6, No. 3, pp. 479–483, Mar. 1997.
- [68] C. Liu, R. Szeliski, S.B. Kang, C.L. Zitnick, and W.T. Freeman, "Automatic estimation and removal of noise from a single image," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 30, No. 2, pp. 299–314, Feb. 2008.
- [69] M.G. Choi, J.H. Jung, and J.W. Jeon, "No-reference image quality assessment using blur and noise," *International Journal of Electrical and Electronics Engineering*, Vol. 3, No. 6, pp. 318–322, Jun. 2009.
- [70] J. Canny, "A computational approach to edge detection," *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. PAMI-8, No. 6, pp. 679–698, Nov. 1986.
- [71] S. McHugh, Digital photography tutorials, 2005.
Available from: <http://www.cambridgeincolour.com/tutorials.htm>
- [72] 3DHISTECH Ltd. <http://www.3dhistech.com/>
- [73] P.A. Bautista, and Y. Yagi, "Improving the visualization and detection of tissue folds in whole slide images through color enhancement," *Journal of Pathology Informatics*, Vol. 1, No. 25, Nov. 2010.
- [74] 三谷商事株式会社ビジュアルシステム部 <http://mitani-visual.jp/LuminaVision01.html>
- [75] P.L. Dragotti, G. Poggi, and A.R.P. Ragonizi, "Compression of multispectral images by three-dimensional SPIHT algorithm," *IEEE Transaction on Geoscience and Remote Sensing*, Vol. 38, No. 1, pp. 416–428, Jan. 2000.
- [76] K. Shinoda, Y. Murakami, M. Yamaguchi, and N. Ohyam, "Lossless and lossy coding for multispectral image based on sRGB and residual," *Journal of Electronic Imaging*, Vol. 20, No. 2, pp. 023003-1–023003-12, Apr. 2011.
- [77] M. Tashiro, Y. Murakami, T. Obi, M. Yamaguchi, N. Ohyama, "Layered scalable coding of multispectral images based on visible component separation," *Optical Review*, Vol. 18, No. 6, pp. 462–469, Nov. 2011.
- [78] 田代充良, "マルチスペクトル病理画像の圧縮とシステム応用に関する研究," 博士学位論文, 東京工業大学, 2011.

研究業績

本研究に関する投稿論文

1. N. Hashimoto, P.A. Bautista, M. Yamaguchi, N. Ohyama, and Y. Yagi, "Referenceless image quality evaluation for whole slide imaging," *Journal of Pathology Informatics*, Vol. 3, No. 1, 9, Mar. 2012.
2. N. Hashimoto, Y. Murakami, P.A. Bautista, M. Yamaguchi, T. Obi, N. Ohyama, K. Uto, and Y. Kosugi, "Multispectral image enhancement for effective visualization," *Optics Express*, Vol. 19, No. 10, pp. 9315–9329, Apr. 2011.

本研究に関する国際会議発表

1. N. Hashimoto, Y. Murakami, M. Yamaguchi, N. Ohyama, K. Uto, and Y. Kosugi, "Application of multispectral color enhancement for remote sensing," *Proc. SPIE Remote Sensing*, Vol. 8180, 818006, Prague, Czech Republic, Sep. 2011.
2. N. Hashimoto, P.A. Bautista, M. Yamaguchi, N. Ohyama, and Y. Yagi, "Development of image quality evaluation method for whole slide imaging," *1st Congress of the International Academy of Digital Pathology*, Quebec City, Canada, Aug. 2011.
3. N. Hashimoto, P.A. Bautista, M. Yamaguchi, N. Ohyama, and Y. Yagi, "Image quality evaluation methods for whole slide scanning," *64th Annual Meeting of the MGH Scientific Advisory Committee*, Boston, MA, Apr. 2011.
4. N. Hashimoto, P.A. Bautista, M. Yamaguchi, N. Ohyama, and Y. Yagi, "Image quality evaluation methods for whole slide imaging," *New England Science Symposium*, 152, Boston, MA, Apr. 2011.
5. N. Hashimoto, Y. Murakami, M. Yamaguchi, T. Obi, and N. Ohyama, "Color enhancement of multispectral images for effective visualization," *Proc. IS&T 5th European Conference on Colour in Graphics, Imaging and Vision*, pp. 282–288, Joensuu, Finland, Jun. 2010.

学会・研究会等における発表

1. 橋本典明, 村上百合, 山口雅浩, 大山永昭, "マルチスペクトル画像を用いたヘマトキシリン単染色標本からのデジタル染色手法," 日本光学会年次学術講演会予稿集, 28aH5, 大阪, 2011年11月.
2. 橋本典明, Pinky A. Bautisa, 山口雅浩, 大山永昭, 八木由香子, "Whole Slide Imaging の

ための画質評価手法とその応用，”第5回応用物理学会新画像システム・情報フォトニクス研究討論会，pp. 48–49，横浜，2011年5月。

3. 橋本典明，村上百合，山口雅浩，小尾高史，大山永昭，“マルチスペクトル画像を用いた色強調における可視化手法の検討，”第4回応用物理学会新画像システム・情報フォトニクス研究討論会，pp. 37–38，大阪，2010年6月。
4. 橋本典明，村上百合，山口雅浩，小尾高史，大山永昭，“マルチスペクトル画像の色強調における表示色マッピング手法，”電子情報通信学会2010年総合大会，pp. 111，仙台，2010年3月。
5. 橋本典明，村上百合，山口雅浩，小尾高史，大山永昭，“マルチスペクトル色強調における可視化手法の設計，”第70回応用物理学会学術講演会，pp. 920，富山，2009年9月。
6. 橋本典明，田代充良，村上百合，山口雅浩，小尾高史，大山永昭，八木由香子，“マルチスペクトル Whole Slide Image ビューアシステム，”電子情報通信学会2009年総合大会，pp. 258，松山，2009年3月。

その他の国際会議発表

1. F. Yang, K. Wakunami, K. Shinoda, N. Hashimoto and M. Yamaguchi, “Digital color management in holoprinter,” *Proc. Digital Holography and Three Dimensional Imaging Conference*, DWC5, Tokyo, Japan, May 2011.
2. M. Tashiro, N. Hashimoto, Y. Murakami, M. Yamaguchi, T. Obi, N. Ohshima, and Y. Yagi, “Multispectral whole slide imaging system,” *Advance Practice Instruction & Innovation through Informatics*, 526, Pittsburgh, PA, Oct. 2008.
3. N. Hashimoto, S. Imaizumi, M. Fujiyoshi and H. Kiya, “Hierarchical encryption using short encryption keys for scalable access control of JPEG 2000 coded images,” *Proc. IEEE International Conference on Image Processing*, pp. 3116–3119, San Diego, CA, Oct. 2008.

その他の学会・研究会等における発表

1. 田代充良，橋本典明，村上百合，山口雅浩，小尾高史，大山永昭，八木由香子，“マルチスペクトル Whole Slide Imaging ビューワのための符号化方式の検討，”第3回応用物理学会新画像システム・情報フォトニクス研究討論会，pp. 44–45，東京，2009年5月。
2. 橋本典明，藤吉正明，貴家仁志，“準結託攻撃耐性を有する JPEG 2000 符号化画像のための階層的暗号化法，”電子情報通信学会信号処理研究会，Vol. 108, No. 3, pp. 1–6 東京，2008年4月。