

分光透過率を用いた組織標本の分析

— 染色状態の定量化手法の検討

Analysis of tissue samples using transmittance spectra

— The method of considering the differences of dying conditions

通信・放送機構 赤坂ナチュラルビジョンリサーチセンター、東工大 像情報*、
東工大 フロンティア創造開発センター**、東京医科大学 病理学第一講座***
○藤井 恵子、山口 雅浩*、大山 永昭*、向井 清**
TAO Natural Vision Akasaka R. C., Tokyo Inst. of Tech. Imaging Sci. & Eng. Lab.*,
Tokyo Inst. of Tech. Frontier Collaborating R.C.**, Tokyuu medical school***
K.Fujii, M.Yamaguchi*, N.Ohyama**, and K. Mukai****

[はじめに]

病理診断は、染色された組織のプレパラートを病理医が光学顕微鏡で観察することで行われているが、その診断基準は非常に複雑である⁽¹⁾。このため、多くの医師間で共有できるような客観的な診断基準を確立することが非常に難しく、現在もその診断のほとんどを医師の経験に頼っている。

診断基準を複雑にしている主な原因の一つに、色情報の管理が行われていないことがあげられる。染色された組織標本の観察時には、色情報が非常に重要となる。しかし現状は、染色状態、顕微鏡装置の性能や観察時の設定、などのばらつきが非常に大きく、診断に用いられる色情報はこれらのばらつきの影響を大きく受けている。このため、診断基準に絶対的な色情報を用いることができず、個々の医師が経験的に色情報のばらつきを補正している。

このような問題を解決するためには、組織標本の絶対的な色情報である分光透過率に基づく診断が非常に有効である。本研究では、分光透過率に基づく定量的な病理診断を支援するための要素技術の開発を目的とし、顕微鏡とデジタルカメラからなる従来の顕微鏡装置を用いて分光透過率を推定する技術、及び、推定された分光透過率に基づき組織標本の性質や染色状態を定量化するための分析技術の開発を行っている。本発表では、分光透過率を用いて染色状態を定量化する手法の検討結果を報告し、診断に分光透過率を用いることの有効性を示す。

[手法]

HE 染色では、染色状態が良好である場合、Hematoxylin 色素分子 (H 色素分子) が核のみを、Eosin 色素分子 (E 色素分子) が核以外の組織を選択的に染めている。ランバートベールの法則を用いて両色素分子の色素量と組織標本の分光透過率の関係をモデル化する。

Fig. 1 に染色標本の断面図を示す。ランバートベールの法則を用いることで、図中の点 x における光強度 $I(\lambda, x)$ は、次式で表せる。

$$I(\lambda, x) = I_0(\lambda, x) \cdot \text{Exp}\{-c_H(x) \cdot \varepsilon_H(\lambda) - c_E(x) \cdot \varepsilon_E(\lambda) - o(\lambda, x)\} \quad (1)$$

ここで、 $I_0(\lambda, x)$ は x における入射照明光であり、 $c_E(x), c_H(x)$ はそれぞれ、 x における H 色素分子、E 色素分子の色素量であり、 $\varepsilon_H(\lambda), \varepsilon_E(\lambda)$ はそれぞれ、H 色素分子、E 色素分子の吸光度である。また、 $o(\lambda, x)$ は組織自体の吸光度である。 $\varepsilon_H(\lambda), \varepsilon_E(\lambda), o(\lambda, x)$ が既知であれば、簡単な行列計算で $c_E(x), c_H(x)$ を得ることが出来る。ここでは、 $\varepsilon_H(\lambda), \varepsilon_E(\lambda)$ は予め測定している[Fig.2 参照]。また、未染色の組織標本がほぼ透明であることから、ここでは $o(\lambda, x) = 0$ としている。

色素量と染色状態の関係を明らかにするために、H 色素分子の量 $c_H(x)$ を、核の領域に存在するものの濃度 a_H とあやまって細胞質の領域内に入ってしまったものの濃度 m_H [(3) 式参照]を用いて分解し、E 色素分子の量 $c_E(x)$ を、細胞質の領域内に存在するものの濃度 a_E とあやまって核の中に入ってしまったものの濃度 m_E [(4) 式参照]を用いて分解する。 r_{nu}, r_{cy} はそれぞれ、厚さ方向の核、細胞質の占有率である。

$$c_H = r_{nu} \cdot a_H + r_{cy} \cdot m_E \quad (3)$$

$$c_E = r_{cy} \cdot a_E + r_{nu} \cdot m_H \quad (4)$$

この時、核の領域内に存在する H 色素分子の濃度 a_H 、E 色素分子の濃度 m_E 、細胞質の領域内に存在する E 色素分子の濃度 a_E 、H 色素分子の濃度 m_H はそれぞれ一定である、という仮定を用いている。(3)、(4) 式において、 $r_{nu} = 1, r_{cy} = 0$ の時の c_E 、 $r_{nu} = 0, r_{cy} = 1$ の時の c_H を代入することで、 m_H, m_E 、 a_H, a_E を得ることができる。

ここで、各パラメータと染色状態との関係について整理する。 a_H, a_E は各染色液の濃さを示しており、

a_H と a_E の比率を見ることで染色液の濃さのバランスがわかる。また、 m_H, m_E は、染色対象としている組織以外の組織に入りこんでしまった色素分子の量であり、染色の選択性の悪さを示している。よって、染色の選択性が良い時の色素量はそれぞれ、 $c_H' = r_{nu} \cdot a_H$ 、 $c_E' = r_{cy} \cdot a_E$ で得られ、これらをもとに、染色の選択性が良い時の分光透過率をシミュレーションで求めることが可能である。

[実験とまとめ]

比較的薄く染色されている標本 sample A、比較的濃く染色されている標本 sample B から得られた結果について示す。Fig.3(a)は色素量 c_H, c_E の算出結果を、Fig.3(b)は選択性の良い染色状態の色素量 c_H', c_E' の推定結果である。Fig.4 は、代表的な2例（核の占有率が非常に高い点 Ex. 1、及び、細胞質の占有率が非常に高い点 Ex. 2）について、もともとの分光透過率と良好な染色状態における分光透過率の推定結果を示したグラフである。良好な染色状態における分光透過率は、Ex.1 については Hematoxyoin 液の分光透過率に、Ex.2 については Eosin 液の分光透過率に近づいており、本手法の妥当性が確認できる。

以上の結果は、染色状態に影響を受けない診断を実現できることの可能性を示唆しており、診断に分光透過率を用いることの有効性を示す結果であると言える。

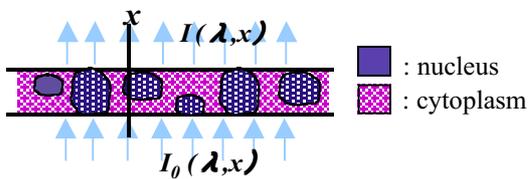


Fig.1 Illustration of section of tissue sample.

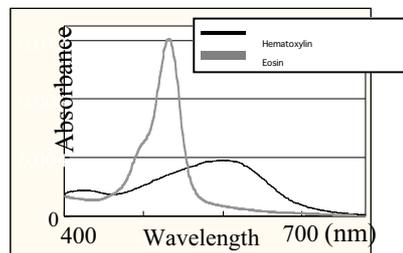
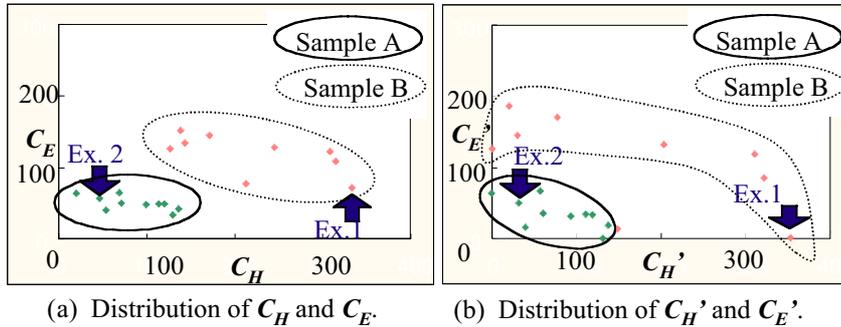


Fig.2 Absorbance of Hematoxylin and Eosin pigments.



(a) Distribution of C_H and C_E . (b) Distribution of C_H' and C_E' .

Fig.3 Pigment quantity estimation of sample A and sample B.

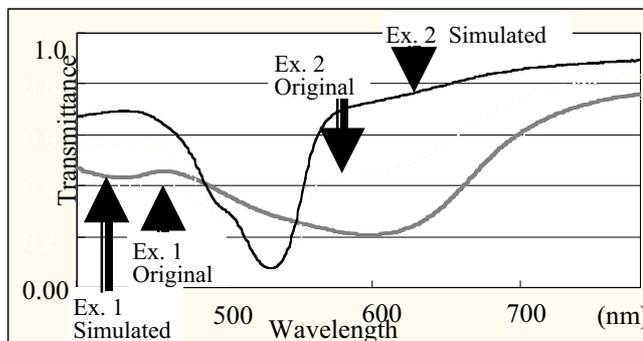


Fig.4 Simulated results of transmittance spectra under better dyeing condition.