

組織画像から得られた空間系列データのスペクトル解析 ：肺組織への適用

三瀬 敬治¹⁾、鷺見 紋子²⁾、傳野 隆一¹⁾

¹⁾ 札幌医科大学医療人育成センター

²⁾ 札幌医科大学医学部衛生学講座

Spectral Analysis of Spatial Series Data of Tissue by Maximum Entropy Method: Application to Image of Mouse Lung

Keiji Mise¹⁾, Ayako Sumi²⁾, Ryuichi Denno¹⁾

¹⁾ Department of Admission, Medical Education Center, Sapporo Medical University

²⁾ Department of Hygiene, School of Medicine, Sapporo Medical University

我々は組織の空間パターンの定量的情報を得るために、マウス肺組織画像から得られた空間系列データに対してスペクトル解析を行った。我々がすでにマウスの小腸に関して報告したように、肺組織においても、組織構造を反映したスペクトル解析結果が得られた。組織の定量的解析方法におけるスペクトル解析の有用性が強く示唆される。

1 はじめに

定量的病理学は現在様々な手法が用いられている。例として形態計測、立体学、ニューラルネットワーク、自己組織マッピング、フラクタル次元、スペクトル解析等を挙げることができる¹⁻⁷⁾。これらの手法のうち、スペクトル解析は病理組織における空間構造の数学的変位の情報を抽出するのに有用である。

Mattfeldt²⁾ は乳腺症と乳ガン組織に従来型のスペクトル解析を適用し、これら二つの組織間での、空間的変位の違いを分類した。その中で、乳腺症と乳がん組織における空間的変異のパワースペクトルは、 $f^{-\beta}$ と記述される、べきスペクトルであると結論づけた。

Miseら⁸⁾ はマウス小腸組織画像から得られた空間系列データに対して、最大エントロピー法 (Maximum Entropy Method ; MEM) に基づいたスペクトル解析を行い、これをモデル画像と詳細に比較検討することにより、スペクトル解析の結果が組織構造の外観や内部構造をよく反映させたものであることを明らかにし、さらにその病的変異との対応が可能であることを示した。MEM スペクトル解析は、組織標本から得られる空間系列データのように、短い長さのデータの周期性を明らかにするのに有用である⁹⁻¹³⁾。

我々は本研究で、肺の組織標本を用いて、同様のスペクトル解析を行い、前回の小腸の場合と同様に肺の

場合でも、スペクトル解析結果が組織の外観や内部構造を反映させるかどうかを検討した。

2 材料と方法

2.1 マウス組織標本

正常成体雌 IRC マウスを用い、頸椎脱臼法で安楽死させた。組織は4%ホルムアルデヒドを含む中性緩衝液によって室温で固定し、パラフィン包埋後5マイクロメートルの切片とした後、一般的なヘマトキシリンおよびエオシン標本とした。

2.2 マウス組織の画像データ

マウス各組織のプレパラート画像をニコン Eclipse E600 光学顕微鏡で拡大観察した (対物レンズは10倍)。視野はニコン・イメージ解析システム ATC-1 とデジタルカメラ NikonDXM1200 で1280ピクセル×1024ピクセルのカラー画像に変換された。カラー画像はハードディスクにTiff形式で保存された。それぞれの画像は512×512ピクセル (これはマウス小腸切片の337 μ m四方に相当する) に切り取られる。すなわち、1ピクセルは0.658 μ m (=337 μ m/512) に相当する。次に、カラー画像は白黒画像に変換され、それぞれの画素は0 (黒) から255 (白) の間の整数値を取る。すなわち、白黒画像の明るい部分が暗い部分よりも大きな値を示す。

2.3 空間系列データの作成

グレー画像から空間系列データを得るために、水平方向、x 軸 (0 から 511 として記述される) の各座標において、垂直方向 y 軸の 512 の列 (0 から 512 として記述) の値を合計した。その結果、512 の連続したデータ $S(x)$ (それぞれ 0 から 130,560) がスペクトル解析の空間系列データとして保存される。

2.4 スペクトル解析

今回のスペクトル解析は MEM に基づいている。MEM スペクトル解析では、パワースペクトル密度 (PSD) は空間系列データから計算される。MEM-PSD の式 $P(f)$ (f : 周波数)、は等間隔にサンプリングされた Δx に対して、以下のように記述される。

$$P(f) = \frac{P_m \Delta x}{\left| 1 + \sum_{k=-m}^m \gamma_{m,k} \exp[-i2\pi f k \Delta x] \right|^2} \quad (1)$$

ここで P_m は次数 m (あるいはラグ) の予測誤差フィルターの出力であり、 $\gamma_{m,k}$ は対応するフィルター係数、 $m=0, 1, 2, \dots, M$ (M は最適フィルター次数) の値である。 P_m と $\gamma_{m,k}$ は、Burg の手続きを用い、Yule-Walker の方程式を解くことによって決定される。 M の値の決定方法に関しては引用文献 11 の § 5.1 を参照されたい。(1) 式の詳細については、Seido と Ohtomo^{14, 15)} および Tokiwano ら¹⁶⁾ らが述べている。

3 結果

肺組織のプレパラートから得られた 4 画像に関してスペクトル解析を行った。例として、4 画像のうちの 1 つの画像に関して、得られた解析結果を Fig.1 に示す。Fig.1 (a) は肺の組織標本から得られたグレー画像、Fig.1 (b) はグレー画像から得られた空間系列データである。

Fig.1 (c) にグレー画像から得た空間系列データ [Fig.1 (b)] の MEM-PSD の片対数プロットを周波数 f (単位: 1/pixel) が 0.125 以下の範囲で示す。この PSD [Fig.1 (c)] には多くの明らかなスペクトルピークがはっきりと観察される。それらのスペクトルの周期 ($T=1/f$) とそれに対応する周波数 (f)、そして強さ (パワー) を、パワー値が大きい順に 20 のスペクトルを選んで、Table1 (a) に示す。PSD のパワー値は、それぞれの PSD のピークを挟む空間を積分することで求める。

最も支配的なスペクトル・ピーク [Fig.1 (c)] は、 $f=0.001$ (791.1-ピクセル周期) に観察されるが、これは画像の幅 512 ピクセルよりも大きい。画像の幅

512 ピクセルよりも短い周期のもので、もっとも支配的なピークは、基本モード $f_1=0.003$ (286.4 ピクセル周期) に観察される。 f_1 の高調波 $f_2 (=f_1 \times 2)$ 、 $f_3 (=f_1 \times 3)$ 、...、 $f_{10} (=f_1 \times 10)$ は PSD [Table1 (a)] の $f=0.007, 0.011, \dots, 0.034$ で観察され、これはそれぞれ 144-, 94-, ...、29-ピクセル周期に対応する。 f_1-f_{10} のスペクトルが f_1 の高調波であるのか、あるいはグレー画像から得られた空間系列データの周期特性を示すものであるのかを明らかにすることは非常に重要である。

肺組織画像のスペクトル解析結果のうち、パワー値が大きい 20 のスペクトル・ピークを Table1 (a) にまとめる。パワー値が最も大きいピーク $f=0.001$ の

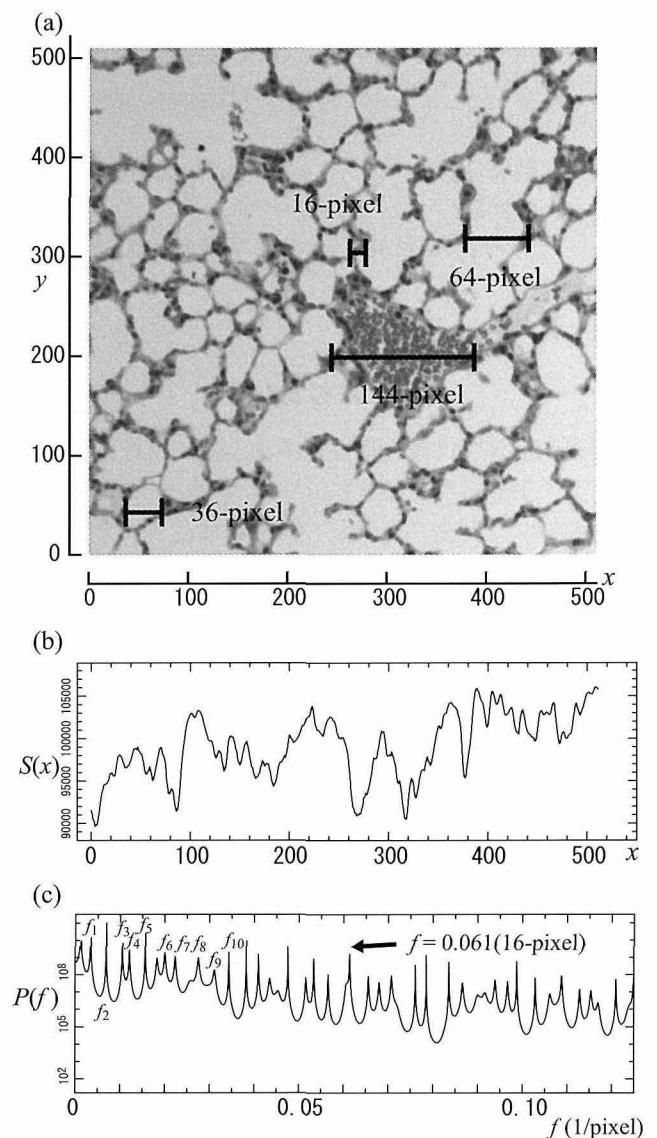


Fig.1 : 肺組織の解析結果

肺の組織標本から得られた解析結果。1 (a) 肺の組織標本から得られたグレー画像、1 (b) グレー画像から得られた空間系列データ、1 (c) 空間系列データのスペクトル解析結果の片対数プロット

組織画像から得られた空間系列データのスペクトル解析：肺組織への適用

パワー値は 4174.3、基本モード $f_1=0.03$ のパワー値は 2006.6 である。パワー値の右肩に示す片括弧の数字は、パワー値の大きい順を示している。

同様に、他の 3 画像についても空間系列データを得、スペクトル解析を行った。スペクトル解析の結果から、パワー値が大きい 20 のスペクトル・ピークを選んで、それらのピークの周期 ($T=1/f$) とそれに対応する周波数 (f) と強さ (パワー) と共に Table1 (b)-(d) に示す。基本モード f_1 は、画像の幅 512 ピクセルよりも短い周期で、かつ他のピークと比較してパワー値の大きいものから選び、ここから高調波 f_2-f_{10} に対応するピークを決定した。

(b) では最も支配的なスペクトル・ピークは、 $f=0.001$ (886.0-ピクセル周期) に観察されるが、これは画像の幅 512 ピクセルよりも大きい。画像の幅 512 ピクセルよりも短い周期のもので、もっとも支配的なピークは、基本モード $f_1=0.003$ (287.1 ピクセル周期) に観察される。この高調波 $f_2 (=f_1 \times 2)$ 、 $f_3 (=f_1 \times 3)$ 、...、 $f_{10} (=f_1 \times 10)$ は PSD の $f=0.006$ 、0.012、...、0.038 で観察され、これはそれぞれ 159-、85-、...、26-ピクセル周期に対応する。

(c) では最も支配的なスペクトル・ピークは、 $f=0.001$ (926.4-ピクセル周期) に観察されるが、これは画像の幅 512 ピクセルよりも大きい。画像の幅 512 ピクセルよりも短い周期のもので、もっとも支配的なピークは、基本モード $f_1=0.009$ (116.6 ピクセル周期)

に観察される。この高調波 $f_2 (=f_1 \times 2)$ 、 $f_3 (=f_1 \times 3)$ 、...、 $f_{10} (=f_1 \times 10)$ は PSD の $f=0.019$ 、0.023、...、0.071 で観察され、これはそれぞれ 54-、43-、...、14-ピクセル周期に対応する。

(d) では最も支配的なスペクトル・ピークは、 $f=0.001$ (747.9-ピクセル周期) に観察されるが、これは画像の幅 512 ピクセルよりも大きい。画像の幅 512 ピクセルよりも短い周期のもので、もっとも支配的なピークは、基本モード $f_1=0.006$ (287.1 ピクセル周期) に観察される。この高調波 $f_2 (=f_1 \times 2)$ 、 $f_3 (=f_1 \times 3)$ 、...、 $f_{10} (=f_1 \times 10)$ は PSD の $f=0.011$ 、0.020、...、0.060 で観察され、これはそれぞれ 90-、50-、...、17-ピクセル周期に対応する。

4 考 察

Misc⁸⁾ らは、マウス小腸組織画像から得られた空間系列データに対してスペクトル解析を行い、これをモデル画像と詳細に比較検討するとにより、スペクトル解析の結果が組織構造の外観や内部構造をよく反映させたものであることを明らかにした。

Table1 (a) において、基本モード $f_1=0.003$ 、(286.4 ピクセル周期)、 $f_2=0.007$ 、(286.4 ピクセル周期) としたが、それぞれのパワー値は 2006.2×10^3 および 1992.3×10^3 とほぼ同等である。これは、 f_2 が f_1 の高調波だけではなく、肺組織の構造を反映している可能性を示す。

Table 1：4つの画像から得られた空間系列データのスペクトル解析結果。

1 ピクセルは $0.658\mu\text{m}(=337\mu\text{m}/512)$ に相当する。*：特徴的なピークの周期。周波数、周期、パワー値も太字で示している。ⁿ⁾：パワー値の順位

(a) Lung1			(b) Lung2			(c) Lung3			(d) Lung4						
f	T	Power	f	T	Power	f	T	Power	f	T	Power				
(1/pixel)	(Pixel)	($\times 10^3$)	(1/pixel)	(Pixel)	($\times 10^3$)	(1/pixel)	(Pixel)	($\times 10^3$)	(1/pixel)	(Pixel)	($\times 10^3$)				
0.001	791.1	4174.3 ⁽¹⁾	0.001	886.0	13984.4 ⁽¹⁾	0.001	926.4	4231.6 ⁽¹⁾	0.001	747.9	580.5 ⁽⁴⁾				
(f_1)	0.003	286.4	2006.6 ⁽²⁾	(f_1)	0.003	287.1	13544.5 ⁽²⁾	0.006	181.0	773.1 ⁽⁴⁾	0.004	262.9	253.1 ⁽⁹⁾		
(f_2)	0.007	*143.8	1992.3 ⁽³⁾	(f_2)	0.006	158.7	2380.7 ⁽³⁾	(f_1)	0.009	116.6	1161.3 ⁽²⁾	(f_1)	0.006	162.0	1047.6 ⁽²⁾
(f_3)	0.011	94.5	753.5 ⁽⁵⁾	(f_3)	0.012	85.4	585.3 ⁽⁶⁾	0.011	92.4	785.9 ⁽³⁾	0.009	108.5	88.8 ⁽¹⁵⁾		
(f_4)	0.012	82.3	494.8 ⁽⁷⁾	(f_4)	0.014	*73.7	763.9 ⁽⁴⁾	0.013	78.2	197.0 ⁽¹¹⁾	(f_2)	0.011	*89.8	1203.4 ⁽¹⁾	
	0.016	*63.8	1293.3 ⁽⁴⁾	(f_5)	0.017	59.0	585.8 ⁽⁵⁾	0.015	*66.8	629.0 ⁽⁶⁾	0.014	73.7	314.6 ⁽⁸⁾		
(f_5)	0.018	54.6	430.2 ⁽⁹⁾	(f_6)	0.020	50.8	160.9 ⁽⁸⁾	(f_2)	0.019	53.8	615.6 ⁽⁷⁾	(f_3)	0.020	50.2	504.9 ⁽⁵⁾
(f_6)	0.020	49.8	746.6 ⁽⁶⁾	(f_7)	0.022	44.5	77.2 ⁽¹⁴⁾	0.020	49.7	222.3 ⁽¹⁰⁾	0.022	46.3	435.1 ⁽⁷⁾		
(f_7)	0.022	44.7	397.1 ⁽¹⁰⁾		0.027	36.8	72.2 ⁽¹⁶⁾	(f_3)	0.023	43.3	288.9 ⁽⁸⁾	(f_4)	0.025	39.8	187.5 ⁽¹¹⁾
	0.026	38.7	65.7 ⁽¹⁸⁾	(f_8)	0.028	35.2	82.8 ⁽¹³⁾	0.026	38.8	40.3 ⁽¹⁸⁾	0.028	*35.9	810.8 ⁽³⁾		
(f_8)	0.028	*36.3	477.3 ⁽⁸⁾	(f_9)	0.032	*30.8	340.0 ⁽⁷⁾	0.028	*36.1	765.0 ⁽⁵⁾	(f_5)	0.031	32.4	165.3 ⁽¹²⁾	
(f_9)	0.031	32.1	141.3 ⁽¹⁴⁾	(f_{10})	0.038	26.4	135.9 ⁽¹¹⁾	(f_4)	0.033	30.4	82.5 ⁽¹⁵⁾	0.034	29.2	45.5 ⁽¹⁷⁾	
(f_{10})	0.034	29.1	123.9 ⁽¹⁶⁾		0.041	24.6	84.6 ⁽¹²⁾	0.037	26.7	130.8 ⁽¹³⁾	(f_6)	0.037	27.1	449.2 ⁽⁶⁾	
	0.038	26.1	221.0 ⁽¹¹⁾		0.045	22.4	66.7 ⁽¹⁷⁾	0.039	25.5	118.2 ⁽¹⁴⁾	0.040	25.1	197.5 ⁽¹⁰⁾		
	0.041	24.4	133.8 ⁽¹⁵⁾		0.046	21.7	76.2 ⁽¹⁵⁾	(f_5)	0.043	23.3	132.4 ⁽¹²⁾	(f_7)	0.043	23.3	95.7 ⁽¹⁴⁾
	0.044	23.0	38.4 ⁽¹⁹⁾		0.049	20.4	47.5 ⁽²⁰⁾	(f_6)	0.050	*19.9	244.9 ⁽⁹⁾	(f_8)	0.048	20.7	68.0 ⁽¹⁶⁾
	0.048	21.0	176.1 ⁽¹³⁾	0.053	*18.8	159.7 ⁽⁹⁾		(f_7)	0.055	18.2	71.1 ⁽¹⁶⁾	0.055	18.3	42.7 ⁽¹⁸⁾	
	0.053	18.7	68.0 ⁽¹⁷⁾	0.057	*17.6	139.0 ⁽¹⁰⁾		(f_8)	0.065	15.5	36.2 ⁽¹⁹⁾	(f_9)	0.058	*17.4	127.2 ⁽¹³⁾
	0.061	*16.3	191.7 ⁽¹²⁾	0.068	14.7	59.2 ⁽¹⁸⁾		(f_9)	0.069	14.5	29.1 ⁽²⁰⁾	(f_{10})	0.060	16.7	40.1 ⁽¹⁹⁾
	0.099	10.1	31.7 ⁽²⁰⁾	0.499	2.0	49.3 ⁽¹⁹⁾		(f_{10})	0.071	14.1	40.3 ⁽¹⁷⁾	0.077	13.0	35.9 ⁽²⁰⁾	

同様に、 $f_8=0.028$ (36.3-ピクセル周期) のパワー値も肺組織の構造を反映している可能性を示す。

また f_1 の高調波以外に、 $f=0.016$ 、(63.8-ピクセル周期) および $f=0.061$ 、(16.3-ピクセル周期) にパワー値の大きい特徴的なピークが観察される。Table1 (a) では、これら4つのピークを太字で、周期にアスタリスク(*)を添えて表示している。

Fig.1 (a) に、これら4つの周期が組織画像においてどの程度の幅であるかを示す。スペクトル解析結果のピークの周期を組織構造と対応させるためには、Miseら⁸⁾の報告で行われているように、モデルと比較して詳細な検討をすることが必要であるが、肺胞管、肺胞、上皮などの幅と近いことがわかる。

他の3つの肺組織画の場合 [Table1 (b)、(c)、(d)]、基本モードはFig.1 (a) の肺組織とは異なる値に同定された。Table1 (b) では基本モード $f_1=0.003$ (287.1ピクセル周期)、(c) では基本モード $f_1=0.009$ (116.6ピクセル周期)、(d) では基本モード $f_1=0.006$ (1047.6ピクセル周期) と同定された。4つのスペクトル解析結果を比較すると、いずれの肺組織画像でも、60から90ピクセル、30から36ピクセル、16から20ピクセル周期の特徴的なピークが得られることがわかる。Table1 (b)、(c)、(d) で、これらのスペクトル・ピークを太字で、周期に*を添えて表示している。

このことから、60~90ピクセル、30~36ピクセル、および16~30ピクセルは、肺組織に共通する構造からもたらされたものである可能性が高い。この幅は、Fig.1に示したように肺胞管、肺胞、上皮の幅と近く、これらの構造は組織画像によらず同様な大きさを示している。これは、肺胞管、肺胞、上皮の構造がスペクトル解析結果のスペクトル・ピークとして得られている可能性を示唆している。

人間は組織画像を見たとき、様々に異なった標本を見ても、同様のものを分類認識することが可能である。同様のものとはすなわち、パターンであり、画像全体にパターンが現れているものであれば、それは画像から得られる空間系列データのスペクトル・ピークに反映する。

今後さらに多くの画像を解析し、共通して見えてくるものはどのようなものであるか、他の組織、特に肝臓や脾臓などの実質臓器の場合はどのような情報を得ることが可能であるか興味深い点である。

組織とモデルの空間系列データの定量的評価 (Table1) は、本研究で用いたスペクトル解析の手法が、これまで使われてきた従来型のスペクトル解析の不利な点、すなわち有限時系列データを $-\infty$ から ∞ まで周期的に延長する非現実的仮定や、window関数を導入しなければならぬことによる分解能の低下などの問

題を乗り越え、スペクトル解析を高精度に行うことによって可能となった¹⁸⁻²⁰⁾。この正確さは、カオス・システムの数学的モデルとして広く知られているRösslerモデル、susceptibles/exposed/infectives/recovers (SEIR) モデルなどを用いたこれまでの研究によって、確認されている^{7, 9, 10)}。今回のスペクトル解析方法が、カオス解析、立体学、自己組織化マップなど、他の定量的組織学手法と同様に、組織やそのモデルの空間構造の定量的評価を行うための有用なツールとなることが期待される。

文 献

- 1 J. P. A. Baak: Anal. Quant. Cytol. Histol. 9 (1987) 89.
- 2 T. Mattfeldt: J. Microsc. 185 (1997) 47.
- 3 S. S. Cross: J Pathol. 182 (1997) 1.
- 4 R. Calvello, M. Saccia, A. B. Maffione, M. A. Panaro, and V. Mitolo: Immunopharmacol. Immunotoxicol. 24 (2002) 139.
- 5 T. Mattfeldt, D. Trijic, H-W. Gottfried, and H. A. Kestler: BJU Int. 93 (2004) 284.
- 6 C.V. Howard and M. G. Reed: Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy (BIOS Scientific, New York, 2005) 2nd ed., p. 7.
- 7 A. Sumi, K. Mise, T. Torigoe, N. Kobayashi, and N. Ohtomo: Sapporo Ika Daigaku Igakubu Fuzoku Rinkai Igaku Kenkyujo Kiyō 6 (2005) 100 [in Japanese].
- 8 K. Mise, A. Sumi, N. Kobayashi, T. Torigoe, N. Ohtomo: J. Jpn. J. Appl. Phys. 48 (2009) 17001.
- 9 N. Ohtomo, A. Sumi, Y. Tanaka, K. Tokiwao, and S. Terachi: J. Phys. Soc. Jpn. 65 (1996) 2811.
- 10 A. Sumi, N. Ohtomo, and Y. Tanaka: Jpn. J. Appl. Phys. 36 (1997) 7460.
- 11 A. Sumi, L. F. Olsen, N. Ohtomo, Y. Tanaka, and S. Sawamura: Jpn. J. Appl. Phys. 42 (2003) 721.
- 12 A. Sumi, N. Ohtomo, Y. Tanaka, S. Sawamura, L. F. Olsen, and N. Kobayashi: Jpn. J. Appl. Phys. 42 (2003) 7611.
- 13 A. Sumi, N. Ohtomo, Y. Tanaka, A. Koyama, and K. Saito: Jpn. J. Appl. Phys. 36 (1997) 1303.
- 14 T. Seido and N. Ohtomo: Jpn. J. Appl. Phys. 24 (1985) 1204.
- 15 T. Seido and N. Ohtomo: Jpn. J. Appl. Phys. 25 (1986) 248.
- 16 K. Tokiwano, N. Ohtomo, and Y. Tanaka: *Saidai Entoropi-ho ni-yoru Jikeiretsu Kaiseki: MemCalc no*

- Riron to Jissai* (Time Series Analysis by Maximum Entropy Method --Theory and Its Applications of MemCalc--) (Hokkaido University Press, Sapporo, 2002) p.73 [in Japanese].
- 17 D. S. Weinberg : in *Image Analyses, A Primer for Pathologists*, ed. A. M. Marchevsky and P. H. Bartels (Raven Press, New York, 1994) p. 235.
- 18 N. Ohtomo and Y. Tanaka : in *A Recent Advance in Time Series Analysis by Maximum Entropy Method, Applications to Medical and Biological Sciences*, ed. K. Saito, A. Koyama, K. Yoneyama, Y. Sawada, and N. Ohtomo (Hokkaido University Press, Sapporo. 1994) p. 11.
- 19 N. Ohtomo, S. Terachi, Y. Tanaka, K. Tokiwano, and N. Kaneko: *Jpn. J. Appl. Phys.* 33 (1994) 2821.
- 20 M. Yamada: *Shisutemu/Seigyo/Joho* 37 (1993) 383 [in Japanese] .