

利用相似性擷取的肝癌細胞分級輔助系統

吳彥敏	簡鈺軒	戴紹國	詹以吉
朝陽科技大學	朝陽科技大學	朝陽科技大學	台中榮民總醫院
資訊管理系	資訊管理系	資訊管理系	病理部
s9314103@cyut.edu.tw	s9314049@cyut.edu.tw	sgdai@cyut.edu.tw	yejan@vghtc.gov.tw

摘要

雖然有超音波、X 光和核磁共振等的檢測方法，肝臟的病理切片仍是肝癌診斷最準確的方法之一。而其中腫瘤細胞分級結果是肝癌治療和預後的一項很重要的資訊。然而分級的標準是主觀的、非量化的，連資深的病理醫師間，也會因主觀的認定而出現不一致的結果。我們在這篇論文中將利用相似性比對的技術，自資料庫中擷取出相似特徵的切片影像以及其病歷，藉此來輔助醫師進行判讀。我們首先利用一些特殊的影像處理技術將細胞自切片影像切割出來，再根據醫師所認定的肝癌分級標準抽取適當的特徵，據以進行相似性比對。實驗所使用的影像是由資深病理醫師事先分級成正常、等級 1~4，共 5 個類別，每個類別各 45 張影像來驗證我們所使用的 14 種影像特徵。最後再另外取 508 張典型和非典型分級的肝癌切片影像作為影像資料庫，來驗證我們方法的可行性

關鍵詞：相似性擷取，影像資料庫，肝癌細胞分級

1. 前言

根據衛生署報告，肝癌仍是台灣主要的死因之一，因此肝癌的預防和治療是非常重要的。而病理切片檢驗對於肝癌的診斷是最準確的方法之一，尤其是病理切片的肝癌分級結果對於其預後和治療計畫會有著很大的影響。而其分級的標準主要是辨識 6 個主要的特徵，包括細胞核的大小、細胞核和細胞質的比例、核形狀的不規則性、核濃染、核的大小差異顯著、核的紋理等[16,7]。這些特徵以人的肉眼來說都只是感覺而且非常主觀的，就連有經驗醫師也無法達到百分之百的精確，更何況新進醫師。因此以電腦來提供一個量化的、精確的輔助診斷是有其強烈的必要性。

近幾年有相當多的病理切片影像分析方法被提出來，Michael [11]使用紋理特徵來分析細胞影像。Jean[5]提出一個以形狀和大小為基礎的癌腫瘤組織自動辨識系統。Frank 則提出一個系統稱為 Biopsy Analysis Support System (BASS) [4]，它能偵測以 monclonal antibodies 染色的乳癌的細胞核。Abdeltahim[1]則發展了一個以紋理特徵區分正常以及癌化的結腸黏膜。Barbara et al. [3]則採用

Syntactic structure analysis 來進行自動化分析。Kourosh[8]則針對整張影像抽取小波特徵來進行分析。以上的研究多著重在影像分析後直接進行分級，將結果提供給醫師作為參考，而醫師必須決定採用或拒絕其所產生的分級結果。因此分級診斷結果的正確與否仍和醫師的經驗有很大的關係。因此比較合適的輔助方式是將醫院所有的歷史影像加入影像資料庫，利用 Query-by-example 的查詢方式擷取出相關的影像，再參考其病歷以及其後來病情的發展來做一個更正確的分級。尤其是在具爭議性的影像中，例如某些分級標準已經達到等級 4，可是其他分級標準卻被認為是正常，在這個情形下，這個輔助方法會比直接分類的方法更具實用性。本文各章節安排如下：第一節是前言；第二節是細胞核切割；特徵擷取和相似性擷取在第三節；接下來是實驗結果和討論；最後是結論。

2. 細胞核切割

我們實驗中所有使用的影像都是經由下面的過程取得：肝組織可用細針抽取或手術取得，經過福馬林固定和化學藥水處理後，以蠟塊包埋，再切成非常薄的薄片並固定在玻片上，以 Hematoxylin & Eosin(H&E)染色後，置於 400 倍的顯微鏡下以 4080×3072 的高解析度取像。最後再由資深病理醫師參考其病歷給予分級，分級由等級 0 到等級 4 各 45 張。圖 1 為實驗的影像之一，被醫師分級為等級 1。

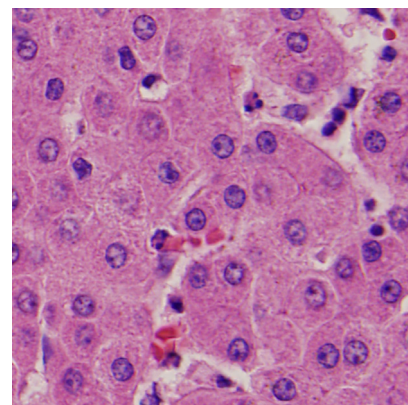


圖 1 等級 1 肝癌病理切片影像

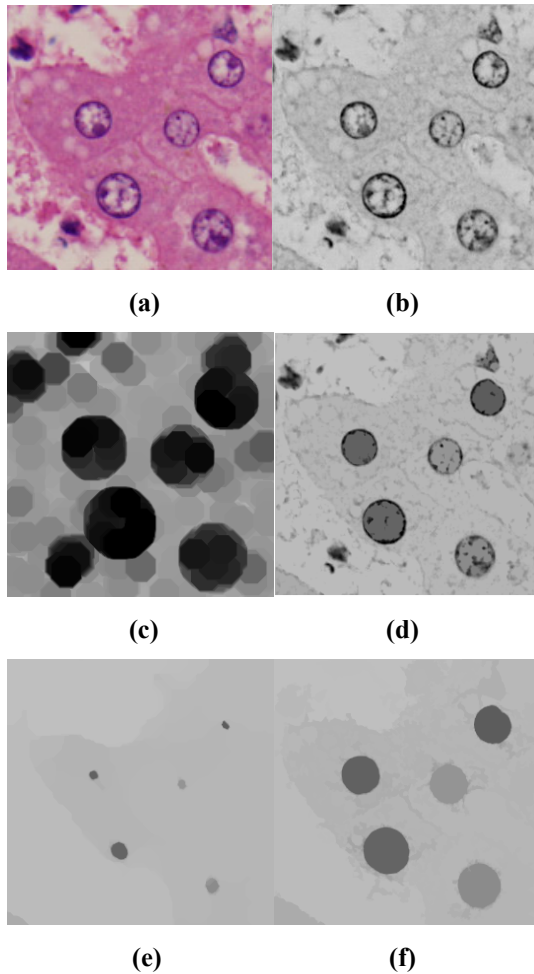


圖 2 使用 DMR 進行細胞核輪廓增強的範例

前述的 6 項分級標準都是和細胞核相關，所以細胞核含有主要的辨識特徵，因此系統的第一個步驟是細胞核切割。如圖 1 所示，細胞核在 H&E 染色後輪廓和核仁會吸收 Hematoxylin 而呈現藍色，但因細胞垂直高度不一而無法讓全部的細胞都正確的聚焦，造成有些細胞核十分模糊，為了讓細胞核的外型能正確的被切割出來，我們採用 Dual Morphological Reconstruction method (DMR)做為切割的第一步驟，來產生較清楚的細胞核輪廓。圖 2 是 DMR 執行的範例，詳細的描述如下：自圖 2(a)取出 RGB 平面中的 R 平面得到圖 2(b)，接下來進行一次 erosion，得到圖 2(c)，圖 2(b)、(c)分別當作 mask 和 marker 執行 Morphological reconstruction [13][17] 得到圖 2(d)，圖 2(b)執行 dilation 後得到圖 2(e)，以圖 2(e)做為 marker，圖 2(d)為 mask 再次執行 Morphological reconstruction 得到圖 2(f)，如此的做法可以去除掉細微的小色塊使細胞核形狀明顯。

第二個步驟則是產生細胞核的遮罩。在這裡使用臨界值的方法[10]會產生很不好的結果，因為 DMR 後各個細胞核的灰階值差異很大，無法找到一個合適的臨界值來切割出所有細胞核的形狀。因此使用 watershed method[6]來找到其輪廓，再產生

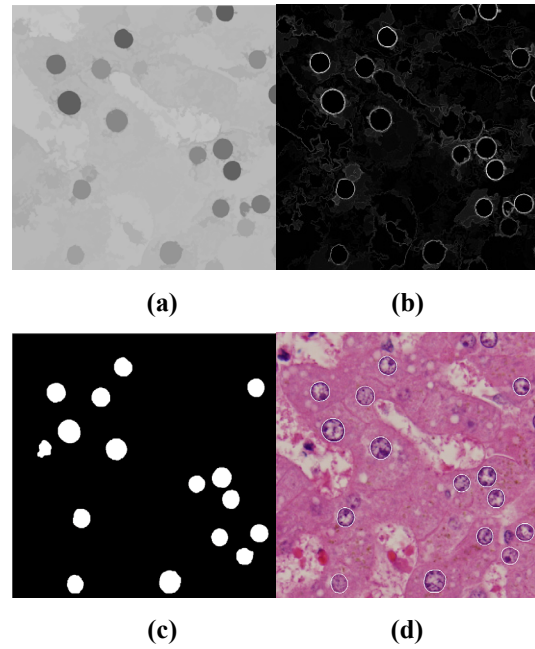


圖 3. 產生細胞核的遮罩的範例以及切割結果

遮罩會是比较好的選擇。如圖 3 所顯示的例子，圖 3(a)是 DMR 後的結果，以 Sobel 邊界偵測子產生斜率，如圖 3(b)所示，最後以 watershed method 產生圖 3(c)的遮罩。圖 3(d)是最後切割的結果。

3. 特徵抽取和相似性擷取

肝癌分級可以分成正常(等級 0)、等級 1~4，而這些分級的標準並不能直接使用在電腦視覺上，因此我們以各種低階的影像特徵來取代 6 個分級的標準，以下是分別針對各個標準所使用的特徵及其詳細說明：

• 細胞核和細胞質的比例

由於腫瘤的增生，導致細胞密度增加，細胞因擠壓變小，而細胞核增大使細胞核和細胞質的比例會增加。因此在這裡將使用三個特徵：核密度、核質比和細胞大小來衡量這個標準。我們將影像中的核當作節點，核和核之間的距離當作權重，整個影像視為 complete connected weighted graph，由這個 graph 計算出 Minimum Spanning Tree (MST)，令所得到的 MST 為 T ; (u,v) 是 T 中的一個邊; $w(u,v)$ 是 u 、 v 的距離; $area_n(v)$ 和 $area_c(v)$ 則是節點 v 的核和細胞質的面積; 核的數量以 $|V|$ 表示。由於 H&E 染色無法將細胞膜突顯出來，所以我們將細胞核擴展至兩核的中點所取得的面積估量值取代細胞質的面積。計算公式如下：

Nuclear density (F_1)

$$\left(\sum_{(u,v) \in T} w(u,v) \right) / (|V| - 1) \quad (1)$$

Nucleus-to-Cytoplasm ratio (F₂)

$$\sum_{v \in T} \left(\text{area_n}(v) / \text{area_c}(v) \right) / |V| \quad (2)$$

Cell size (F₃)

$$\sum_{v \in T} (\text{area_n}(v) + \text{area_c}(v)) / |V| \quad (3)$$

• 核形狀的不規則性

細胞核的形狀是另一項重要的資訊，在等級 0 中核的形狀是非常接近正圓。等級越高，核的形狀就越不規則，例如，在等級 2 中，核會呈現橢圓，而等級 3 則會有尖銳的夾角出現等等。因此針對這個標準我們使用了三個特徵：似圓性 (Circularity)[12]、面積不規則性 (Area irregularity) 輪廓不規則性 (contour irregularity)。似圓性將圓和欲檢視形狀的差距量化，可以檢測出核大致的形狀的差異，其公式如下：

Circularity (F₄)

$$4 \times \pi \times \frac{\text{Area}}{\text{Circumference}^2} \quad (4)$$

但是似圓性只比較面積的不同，對於其外形的變化，並不能完全正確的比對出來。而面積不規則性可以處理面積和圓形接近，但外形有明顯差異的核。如圖 5 所示，首先以 Minimum Bounding Rectangle (MBR) 框住細胞核，四邊和核相接的點各以水平和垂直的方向將核切成 4 個區域，分別是 S1、S2、S3 和 S4，再以下面公式計算其各區域差異最小值，如果形狀越不規則，則值會越大。

Area irregularity (F₅)

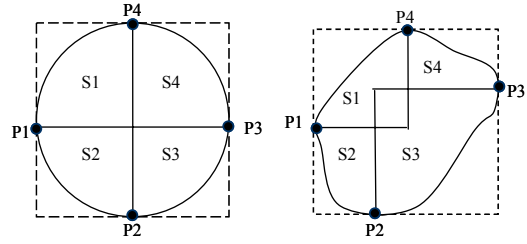
$$\frac{1}{4} \sum_{i=1}^4 \min_{j=1 \dots 4, j \neq i} |\text{area}(S_i) - \text{area}(S_j)| \quad (5)$$

另外尖銳角度的出現暗示著更高的分級，可是輪廓出現尖角會使面積不規則性的區分能力不穩定，所以直接以曲線弧度來偵測輪廓短距離間角度劇烈的變化會是一個很有用的特徵。將輪廓上的像素依序的表示為 $\{p_0 p_1 p_2 \dots p_{j-w} \dots p_j \dots p_{n-1}\}$ ，其中 $pt=pt+n$ ， $t=\dots -1 0 1 \dots$ ，則輪廓上的一點 $p_j=(x_j, y_j)$ 的在一個視窗 w 內的曲度可以表示為[18]

$$d_j = \tan^{-1} \frac{y_j - y_{j-w}}{x_j - x_{j-w}} - \tan^{-1} \frac{y_{j-1} - y_{j-1-w}}{x_{j-1} - x_{j-1-w}} \quad (6)$$

Contour irregularity (F₆)

$$\sum_{j=0}^{n-1} |d_j - d_{j-1}| \quad (7)$$



(a) 圓形核

(b) 形狀不規則的核

圖 5. 面積不規則性的例子

• 核濃染 (Hyperchromatism)

細胞核內的染色質會隨著等級的增高而增加染色的程度，在正常的細胞內則不會有過染的情形發生，因此我們採用兩種特徵來表示：平均亮度 (average intensity)、B/D spot ratio。

Average intensity (F₇): 較高等級的核會因為核濃染而比低等級的核來得暗，因此細胞核平均的亮度是可以當作核濃染的相對估計值。

B/D spot ratio (F₈): 當染色質吸收過多的藍色會使得核內除了核仁外有一顆顆的藍點，在我們所取的 RED-plane 中會呈現暗點，因此可以使用 top-hat 和 bottom-hat transforms [2] 來取得亮點和暗點取其比值，作為另一個核濃染的估計值。

• 細胞核的大小

Area (F₉): 核的面積越大，等級高的機率就越大，因此以其像素的數目來估計其面積。

• 核的大小不一 (Anisonucleosi)

在較高等級的影像中，核大小的變化會很顯著，因此使用下面兩項特徵：

Standard deviation of nuclear size (F₁₀): 核大小的標準差

Difference of extreme nuclear sizes (F₁₁): 最大和最小核的差異

• 核的紋理

我們採用 Gray Level Co-occurrence matrices (GLCM)[14][15][9] 來分析細胞核的紋理，令所產生的 GLCM 為 N_d ，取 $d=1$ and $\theta=0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ 。

Uniformity Energy (F₁₂)

$$\sum_i \sum_j N_d^2[i, j] \quad (7)$$

Contrast (F₁₃)

$$\sum_i \sum_j (i - j)^2 N_d[i, j] \quad (8)$$

Homogeneity (F_{14})

$$\sum_i \sum_j \frac{N_d[i, j]}{1 + |i - j|} \quad (9)$$

分級所使用的 6 個標準使用在各個等級時的權重各不相同，例如核質比對較高的等級會較有高的區分力，可是等級 0, 1, 2 之間並沒有很大的區別，因此在做相似性擷取時，對所要查詢的影像擷取所有的特徵直接作為查詢條件是不切實際的，因此我們採取權重的方式進行相似性擷取。令 NF_{Ai} 和 NF_{Bi} 分別是影像 A, B 的特徵 F_{Ai} 和 F_{Bi} 正規化後的特徵值， w_i 為其權重，其中 $i=1 \sim 14$ ，則影像 A, B 的距離為：

$$distance_{AB} = \sum_{i=1}^{14} w_i (|NF_{Ai} - NF_{Bi}|) \quad (10)$$

圖 6(a)是我們所提供的部分查詢畫面，圖 6(b)是查詢結果，醫師可將所要比對的影像上傳後，設定主要特徵和其權重值進行相似度比對查詢。

4. 實驗結果與討論

實驗所使用的影像均取自台中榮民總醫院，等級從 0 到 4 各 45 張。首先測試各個特徵個別的分級能力，以 leave-one-out 的方式，採用 k-NN 分類法，分別統計各個等級的平均正確率產生如表 1 的結果，由表 1 可以得知大部分的特徵，在其特徵空間內，並無法使各個等級產生群聚現象，因此使用

表 1 各以單一特徵使用 k-NN 分級結果, $k=1 \sim 0$

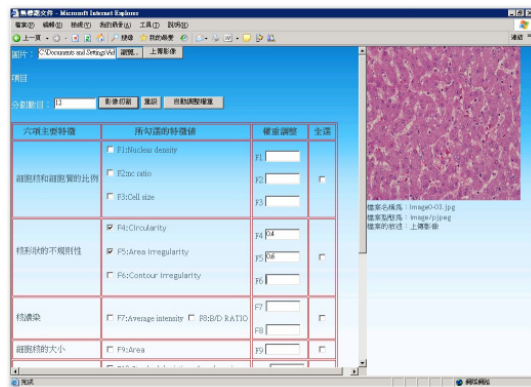
	Grade0	Grade1	Grade2	Grade3	Grade4
F_1	31.56	52.49	25.98	81.63	35.65
F_2	43.95	38.57	32.79	64.2	30.02
F_3	34.47	55.16	26.82	90.72	33.04
F_4	72.99	41.09	31.16	40.84	61.23
F_5	34.62	37.14	59.95	45.68	67.75
F_6	28.74	30.57	39.46	31.31	65.33
F_7	44.25	44.59	21.78	35.7	19.51
F_8	87.71	51.7	42.71	37.98	26.67
F_9	36.4	56.89	45.48	51.51	70.52
F_{10}	30.03	52.25	43.26	43.85	62.86
F_{11}	28.15	48.15	24.3	30.32	54.62
F_{12}	46.91	30.37	32.59	28.84	25.92
F_{13}	56.1	29.68	23.11	27.95	20.1
F_{14}	71.75	38.62	27.75	29.97	28.64

machine-learning 的方法加上 Decision-Tree 會產生較佳的結果。另外表 1 的數值也顯示出每個特徵對於各個等級的區分力差異性很大，顯示每個等級對各個分級標準有不同的權重。

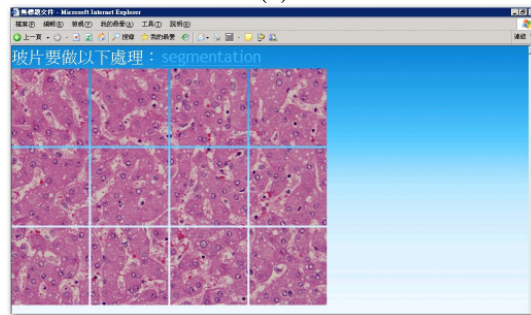
接下來我們分別設定 $k=10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100$ 。計算其正確率，正確率的計算方式如下：

$$precision = \begin{cases} \frac{TP}{k} & \text{if } N \geq k \\ \frac{TP}{N} & \text{if } N < k \end{cases}$$

其中 N 是 positive 的數目， TP 是 true positive，實驗結果列於圖 7。由圖 7 可以得知等級 2 有著最差



(a)



(b)

圖 6 WEB-based 影像資料庫查詢介面

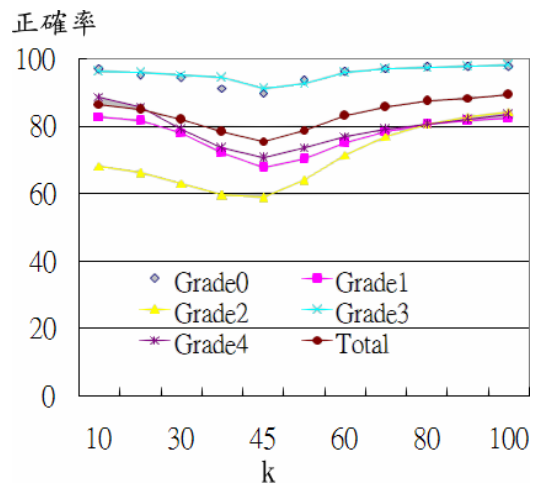


圖 7 各個等級各使用表 2 所列特徵之正確率

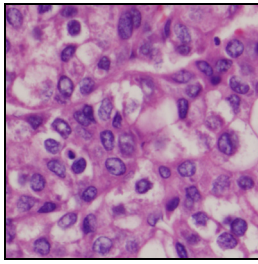


圖 8 Grade 2 的肝癌細胞影像

的群聚，和臨床上驗證，等級 1 表示早期的肝癌，而等級 3~4 則有很差的預後，因此介於兩者之間的等級 2 實際上是不易直接得到很確定的分級結果。也因此使用相似性比對的方式來擷取相關影像和參考病例會是很必要。以 Grade 2 為例，該分類處於較接近正常組織 Grade 1，與較為惡化的 Grade 3 之間的模糊地帶，故此級分類對於醫師在日後治療方針制定上，具有相當程度的重要性，需要經驗豐富的醫師才能加以正確分級。

因此我們另外擷取了 508 張的肝癌細胞影像加入影像資料庫，其中含有部分的非典型分級的肝癌細胞，例如圖 8 醫師所給的等級是 2 或 3，而利用 [18] 的分類方法所得到的結果是 grade 2。我們以之進行相似性擷取實驗，grade 3 與 grade 2 最主要的差異在於核仁濃染程度與核面積不規則性的增加(例如核面積出現尖角的形狀)，分別對應到 B/D spot ratio (F8)與 Area irregularity (F5)兩樣特徵，因此我們給予這兩個特徵較高的權重 0.44，其餘的權重值為 0.01。圖 9 和圖 10 是查詢的結果。其中圖 9 距離最近前 10 名中為 Grade 2 影像，而圖 10 是 grade 3 的結果，以肉眼檢視其核濃染及外型具銳角的程度相近，因此系統除了給予 grade 2 得分級結果外，另外提供十分相近的 grade 3 影像及病歷作為分級比較和參考，因而產生一個更

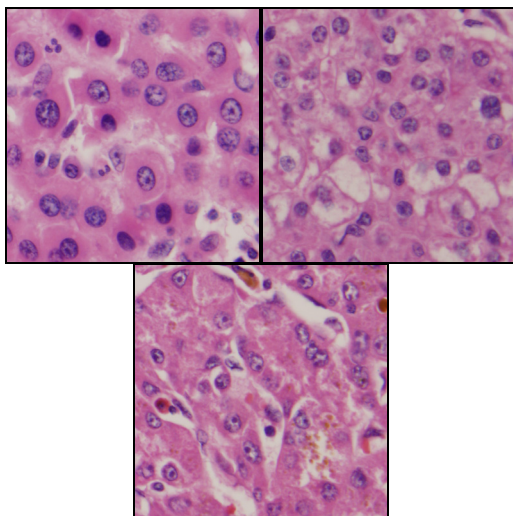


圖 9 利用圖 7 的 F5 和 F8 所做相似度擷取距離最近前 10 名中為 Grade 2 影像

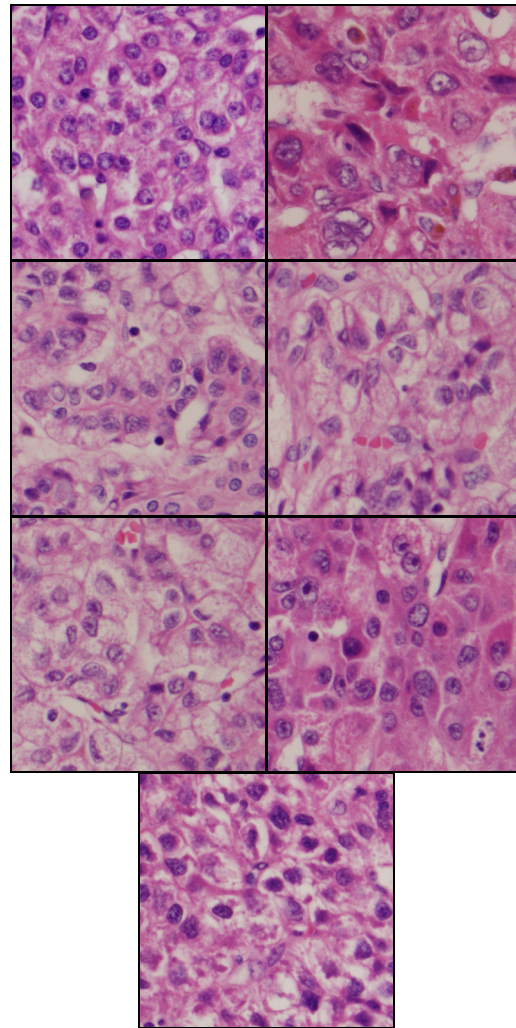


圖 10 利用圖 7 的 F5 和 F8 所做相似度擷取距離最近前 10 名中為 Grade 3 影像

準確的分級診斷。除此之外，系統也可以提供新進醫生執行教育訓練的一個良好的數位學習平台。

5. 結論

在本文中我們利用相似性擷取提供病理切片中的肝癌分級的輔助診斷的方式，不同於之前的輔助診斷，僅僅提供一個分級建議。我們利用相似性擷取的方法，以圖找圖的方式，針對醫師所感到困惑或非典型分級細胞的特徵，自以往的病例中找出類似特徵的影像以及其病歷，提供給醫師做為輔助分級診斷之用。

參考文獻

1. Abdeltahim Nasser Esgiar, Raouf N. G. Naguib, "Microscopic Image Analysis for Quantitative Measurement and Feature Identification of Normal and Cancerous Colonic Mucosa," *IEEE Transaction on Information Technology in*

2. A. Moragas, M. Garcia-Bonafe, I. de Torres, and M. Sans, Textural Analysis of Lymphoid cells in serous effusions. A Mathematical Morphologic Approach, *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, Vol. 15, No. 3, Jun. 1993, pp. 165-170.
3. Barbara et al., "Computer-Assisted Differential Diagnosis of Malignant Mesothelioma Based on Syntactic Structure Analysis," *Cytometry*, Vol. 35, pp. 23-29, 1999.
4. Frank et al., "Computer-Aided Detection of Breast Cancer Nuclei," *IEEE Transaction on Information Technology in Biomedical*, Vol. 1, NO. 2, pp. 128-140, 1997.
5. Jean-Philippe Thiran, Benoit Macq, "Morphological Feature Extraction for the Classification of Digital Images of Cancerous Tissues," *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Vol. 43, NO. 10, pp. 1011-1020, 1996.
6. Jos B.T.M. Roerdink and Arnold Meijster, The Watershed Transform: Definitions, Algorithms and Parallelization Strategies, *Fundamenta Informaticae*, Vol. 41, No. 1-2, Jan. 2000, pp. 187-228.
7. Kamal G. Ishak, Zachary D. Goodman, and J. Thomas Stocker, *Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2001.
8. Kourosh Jafari-Khouzani, Hamid Soltanian-Zadeh, "Multiwavelet Grading of Pathological Images of Prostate," *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Vol. 50, NO. 6, pp. 697-704, 2003.
9. Linda G. Shapiro and George C. Stockman, *Computer Vision*, Prentice Hall, 2001.
10. Mehmet Sezgin and Bulent Sankur, Survey Over Image Thresholding Techniques and Quantitative Performance Evaluation, *Journal of Electronic Imaging*, Vol. 13, No. 1, Jan. 2004, pp. 146-165.
11. Michael Beil, Theano Irinopoulou, Jany Vassy, Gunter Wolf, "A Dual Approach to Structural Texture Analysis in Microscopic Cell Images," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, Vol.48, pp. 211-219, 1995.
12. Murk J. Bottema, Circularity of Objects in Images, *The 2000 IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, Vol. 6, Jun. 2000, pp. 2247-2250.
13. R. M. Haralick, S. R. Sternberg, and X. Zhuang, Image Analysis Using Mathematical Morphology, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 9, No. 4, Jul. 1987, pp. 532-550.
14. Robert Haralick, K. Shanmugam, and Its'hak Dinstein, Texture Features for Image Classification, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, Vol. SMC-3, No. 6, Nov. 1973, pp. 610-621.
15. Robert Haralick, Statistical and Structural Approaches to Texture, *Proceedings of the IEEE*, Vol. 67, No. 5, May 1979, pp. 786-804.
16. Ugochukwu C. Nzeako et al., Tumor Pathology and Survival in HCC, *Cancer*, Vol. 74, No. 4, Mar. 1995, pp. 579-588.
17. Vincent Luc, Morphological Grayscale Reconstruction in Image Analysis: Applications and Efficient Algorithms, *IEEE Transactions on Image Processing*, Vol. 2, No. 2, Apr. 1993, pp. 176-201.
18. Yee-Jee Jan, and Shou-Kuo Dai, and Yan-Hou Lai, "Segmentation and Grading of Hepatocellular Carcinoma in Biopsy Images," The 2007 International Conference on Advanced Information Technologies, Apr. 2007.

致謝

這項研究是由行政院國家科學委員會專案研究計畫 NSC95-2221-E-324-041 所支持。