

[illegible]

執行期間：89 年 02 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

共同主持人：邱元佑

☐赴國外出差或研習心得報告一份

☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 八 十 九 年 十 月 二 十 五 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

腎切片之電腦輔助分析系統之開發

The Development of the Computer-Aided Analysis System for Renal Biopsy

計畫編號：NSC 89-2213-E-041-005

執行期限：89 年 2 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：劉育寰 嘉南藥理科技大學資管系

一、中文摘要

腎臟疾病一直是國人十大死因之一，而臺灣地區因腎衰竭而需透析治療者也有逐年增加的趨勢。因此，腎臟疾病的醫療與診斷將是國內醫療體系所需面臨的一大課題。然而，目前患者的臨床指標（如病理檢查、血清生化數量及放射影像檢查等）所能提供的疾病訊息仍是相當有限且間接的。相關的臨床報告^{[1],[2]}指出，腎臟疾病中結構與其功能間有著密不可分之相關性。因此，腎臟組織病理學的檢查與診斷扮演著有關治療的決定性角色。

由於分子生物學及細胞生理學等基礎醫學研究的進步，臨床醫師對腎臟組織切片的判讀不再只是單獨的辨別染色強弱、組織長度或面積大小而已，細胞內微弱的蛋白質或核苷酸訊息已逐漸成為判讀的重點了。然而，這種複雜的分析常因判讀人員的差別而不易或得高信賴度。因此，本計畫擬藉由影像處理技術來排除週遭背景染色條件的干擾，而正確地判讀出細胞質或細胞核內染色訊息，以免除人為誤差，而達到恆定與一致性的判讀結果。

基於上述理由，本計畫擬根據腎切片影像之特性提出多種分析處理的技術，建立一套腎切片影像分析系統。本系統提供腎絲球活性分析與腎小管組織結構分析功能，同時大幅簡化腎切片繁複的檢視動作並提昇數據分析的精準度與可信度。

關鍵詞：腎切片、腎絲球、腎小管、病理分析

Abstract

Renal disease, such as nephritis or nephropathy, is one of the ten major death diseases in Taiwan. At the same time, incidence of renal replacement therapy (hemodialysis and peritoneal dialysis) is also gradually accrued by anniversary. Accordingly, how to achieve early diagnosis and enhance treatment for kidney disorder would be the major lesion of our medical systematically. Nevertheless, the clues from the clinical data, such as biochemistry examination, serological examination and radiological studies are quite indirect and limited. From the literatures, it is no doubt that pathological examination of kidney will supply the direct evidence and be the most important

for treatment decision-making.

Because of the progress of basic medical science of molecular and cellular biology, pathological reading of renal specimen is not only for staining of tissue structure, length or area of target site. The small and weak signals from the intracellular target gradually become the major roles for disease pathogenesis. However, these always need special tissue staining and quite deftly expert technician. Videlicet, analysis consistency is quite difficult to be maintained due to individual difference of clinicians, status of staining and specimen. Therefore, the purpose of our study is to exploiting image analysis processing technique to ameliorate the quality of tissue pathological analysis. To catch up with intensifies of the weakly signal and artificial intellectual program is the second purpose of our study. By the results of our proposal, we believe it will be easy to keep consistency and accuracy for tissue pathological analysis.

Due to the mention above, many techniques of analyzing and processing based on the characteristics of renal biopsies are proposed, and a system for renal biopsy images analysis is developed. In our system, the analyses for the activity of glomerulus and the structure of renal tubular cell are performed to significantly reduce the complicated procedures of biopsy examination and to increase the accuracy and reliability of the data assessment.

Keywords: Renal Biopsy, Glomerulus, Renal Tubular, Pathological Analysis

二、緣由與目的

依據衛生署於民國 86 年以前所公佈的國人十大死亡原因中，腎臟疾病列名第七位。而於 86 年以後，雖醫療技術仍有長足進步，但腎臟疾病仍位居第八位^[3]，吾人也觀察到台灣地區因腎衰竭而需透析治療者，也有逐年增加的趨勢！由這些事實的存在皆證實著腎臟疾病的醫療與診斷，將是國內醫療體系所需面對的一大課題。

於目前的狀況下，患者的臨床指標（如病理檢查、血清生化的數值和放射影像檢查等）所能提供的疾病訊息仍是相當有限且間接的。如腎病症候群的臨床診斷雖可藉一些臨床指標以為初步診斷；但

事實上，“原發性腎病症候群”卻是包含著四種病理學上的分類，對藥物的治療各有其不同的反應。又如“系統性紅斑性狼瘡”雖也可藉一些臨床指標而得到診斷，但由文獻可得知百分之九十的系統性紅斑性狼瘡皆會侵犯腎臟，且並不全然會表現於尿液之常規檢查。尤有甚者，系統性紅斑性狼瘡對腎臟之侵犯於病理學上之分類有六種之多，也不易由臨床上之表現而得知^[5]。所以組織病理學的檢查與診斷勢必扮演著有關治療的決定性角色^{[1], [2]}！由1970年 Striker GE, *et al.*於 Human Pathology 論及腎病中結構與功能之相關性以來，在技術器材、與方法不斷的演進下，目前這已是一種極其簡單而安全的檢查^[5]。最重要的是組織檢查提供了唯一可客觀觀察與評估腎病型態、位置、影響範圍與疾病進展的方法。早期組織上的染色只涵蓋：hematoxylin eosin、periodic acid-Schiff (PAS)、periodic acid-silver methenamine(PASM)、Masson's trichrome 等染色，現今則可藉著各種免疫組織染色 (Immunohistochemistry)、免疫螢光染色 (immunofluorescence)、原位雜交染色 (In situ hybridization)、更有甚者為原位多核甘酸鏈結反應 (In situ PCR) 等，而使得醫學界對疾病之生理病理制病機轉有更進一步的了解與突破。因此可知組織病生理研究無論對基礎研究或對臨床診斷與治療皆有其不可抹煞的地位。

但也由於基礎醫學研究的進步，如分子生物學、細胞生理學或細胞內訊息傳導等；促使人們需要將細胞內微弱的蛋白質或核甘酸訊息予以染色對比強化以幫助分析。在如此的要求下將造成以往組織於顯微鏡下以目視約略分析染色強弱、組織長度、面積大小等之方法顯得無法應付且耗時，和易因判讀人員之差別而不易獲得高信賴度。為此藉著資訊科技發達之便而輔以電腦影像分析軟體之幫忙，予以幫助臨床組織學檢驗與研究上要求重複、耗時、恆定與一致性的工作項目是吾人的期望與目標。事實上目前市面上已有一些商業軟體運用於細胞影像分析工作，但大多功能仍屬簡單之基本運用，如測量長度、讀取螢光等。若遇需讀取細胞質或細胞核內之染色訊息且排除週遭背景染色的干擾則仍有技術上待克服之問題。另外由於腎臟組織致密與層次豐富的特性，更是現今影像分析軟體功能所不易克服的缺陷。我們的期望與目標是藉著以腎臟疾病組織為基礎，予以發展高解析度與自動化的影像分析系統。吾人相信可藉著影像分析的研究，整合醫學與資訊科技工程，而促使醫療診斷或基礎醫學探討因更精準、迅速且減少人為誤差而獲得長足的進步。

因此，本計畫擬針對腎臟切片影像中之腎絲球與腎小管等組織結構做初步的探討與分析。利用影像處理的技術來完成自動分析與統計的功能，以期減少繁複耗時的檢視步驟，並降低人員判讀的誤差，而得到客觀的分析數據供臨床診斷之用。此外，腎切片的相關檢驗尚有細胞質與細胞核內之染

色訊息的辨別等，亦將在後續的計畫中逐一的尋求解決之道，以期能建構一套完整的切片分析系統。

三、結果與討論

本年度的計劃內容可分為兩大部分：一為系統介面之建立；另一為分析工具之發展。在系統介面建立的部分則以 Microsoft Visual C++ 6.0 為發展工具，所設計之介面力求操作簡單，以便臨床醫師操作使用。在分析工具的發展上則力求模組化，以利功能的擴充與改良。本年度的計劃以腎絲球活性分析與腎小管組織結構分析的功能為主，建立兩套分析模組。各模組所採用的方法茲分析如下：

A. 腎絲球活性分析

根據醫生的需求，臨床上腎切片的腎絲球變化往往可以用來判腎臟疾病的一個重要指標，診斷上腎絲球內細胞的數目是決定病變與否的關鍵，觀察 HE 染色的影像，我們可以找出細胞核所在位置藉此得知腎臟細胞的個數。臨床上再依據眼睛的觀察來決定疾病的嚴重性。為了讓此判斷有一量化的結果，我們應用以下的影像處理方法找出腎絲球中細胞的個數。

由於經過光學的取像結果常常產生許多的雜訊，我們將原始影像(如 Fig. 1)先經高斯模糊轉換去除雜訊，再將彩色影像經 HSI 轉換後取其亮度值形成一灰階影像，此灰階影像雖然去除了顏色的資訊，但仍保有腎絲球的完整結構(如 Fig. 2)。

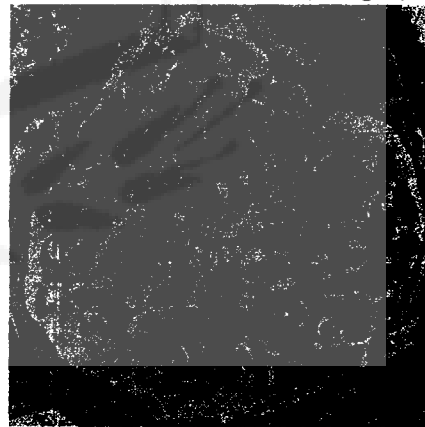


Fig. 1 腎絲球原始影像

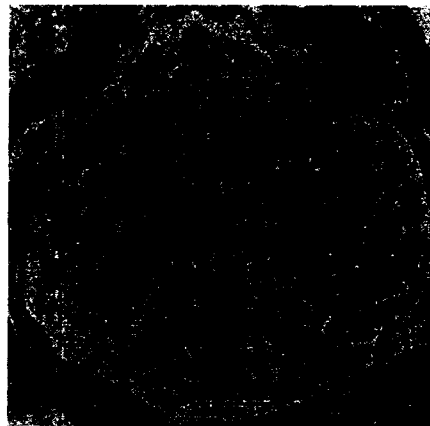


Fig. 2 灰階轉換後的腎絲球影像

為了方便找出影像中所有細胞核的邊界(edge)位置，我們利用 Sobel Edge Detection 作為邊緣的檢測，經過此運算後會產生一梯度(Gradient)影像，其結果如Fig. 3。圖中可見細胞核的邊緣部份亮度較高。此檢測中所使用的遮罩在水平和垂直兩方向上分別為

-1	0	1
-2	0	2
-1	0	1

-1	-2	-1
0	0	0
1	2	1

由Fig. 3中，很明顯的，細胞核都類似圓的形狀。在 Sobel 轉換後的梯度影像中，為了找出影像中所有的細胞核，Hough Transform 可能是最直覺的一種方法。Hough 提出一種方法，通常稱之為 Hough Transform^{[6][7]}。考慮一點 (x_i, y_i) 和圓的方程式 $(x-c_1)^2+(y-c_2)^2=c_3^2$ ，通過 (x_i, y_i) 及固定的半徑 r 可以有無數多的圓，但對於所有的 (c_1, c_2) 都滿足 $(x-c_1)^2+(y-c_2)^2=r^2$ 。考慮不同的 (c_1, c_2) ，對固定的 (x_i, y_i) 所對應的圓方程式所形成的空間稱為“參數空間”(parameter space)。更進一步，第二個點 (x_j, y_j) 在參數空間上也有一個與其相對應的圓。若此圓與 (x_i, y_i) 對應的圓相交於 (x, y) ，則點 (x, y) 為 (x_i, y_i) 與 (x_j, y_j) 在半徑為 r 的共同圓心。若把半徑也考慮進去，則形成的參數空間將會是三維的立體空間。

為了節省運算時間，Hough Transform 把參數空間細分為所謂的累加單元(accumulator cells)。開始時這些單元都設為零，然後對影像上面的每一點 (x_k, y_k) ，計算所有相對應的 (c_1, c_2, c_3) ，並令 $A(p, q, r) = A(p, q, r) + 1$ ，其中 p, q, r 分別為 c_1, c_2, c_3 所在的累加單元。在這一過程結束後， $A(i, j, k)$ 中的值 M 就相對應於在圓 $(x-i)^2+(y-j)^2=k^2$ 上有 M 個像素點。若 M 大於某一閾值(threshold)時就可以判斷在原始影像上有 M 個像點形成一個 (i, j) 為圓心 k 為半徑的圓。

為了適合腎切片影像的特性，我們做了一些改變，在轉換的過程中直接利用 Sobel 轉換後的梯度影像取某一閾值(threshold)去掉非邊緣的像點，並利用轉換後的影像灰階值，作為累加的比重，此舉讓我們找到的結果更具準確性。由於在影像上細胞核大小不一且表現在梯度影像上邊緣的灰階度亦不同，所以在整個轉換過程中，半徑的參數不是選擇單一半徑而是在某一範圍內進行轉換累計，因此計算量也跟著增大許多，為了減少運算時間，在轉換的過程中，我們降低參數空間的解析度，將累加單元的大小依據半徑的參數來決定。

在 Hough 轉換後我們可以在參數空間上找到累加次數較多的點，這些點相對應的圓心及半徑所形成的圓可能就是我們要找的細胞核。從經驗顯示，閾值取的太大則找到的圓會太少，若太小則有一些非細胞核也會出現。解決此一現象，我們採用較小的閾值但同時此點必須是區域的相對最大值，而此區域的大小為其相對的圓的大小。最後我們在原始影像上畫出這些找到的圓，如Fig. 4。

從結果我們發現除了細胞核外，紅血球也出現在結果中(圖中圈選較紅的部分)，目前我們只能依據經驗值將兩者分類。Fig. 4是我們根據半徑從 7~17 個像素點並在 Hough Transform 後取閾值為 65%所得到的實驗結果。其中細胞核個數有 63 個，紅血球個數有 14 個。

在整個腎絲球中能夠提供作為醫生判讀的資訊當然不僅僅只有細胞個數，另外如微血管數量，管腔厚度...等，也都是重要的指標。找出這些腎絲球相關的結構並求出其面積的統計數字將是我們下一階段努力的目標。相信有了這些資訊的輔助，將可提供醫生一簡單量化的數據作為判讀腎臟疾病的參考。

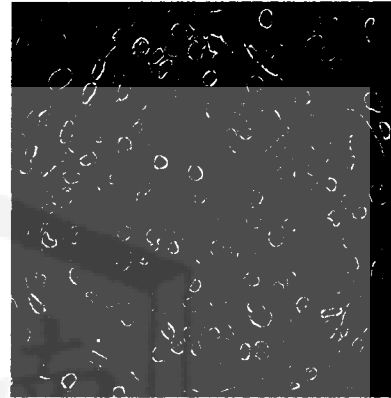


Fig. 3 Sobel Edge Detection 後的腎絲球影像

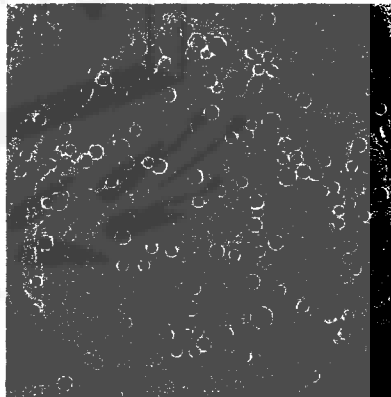


Fig. 4 經 Hough 轉換後找出的細胞核位置

B. 腎小管組織結構分析

在臨床檢驗上，腎小管的緻密度與腎臟的功能有絕對的關係，一般醫師在判斷腎小管緻密度時，通常以目測的判斷為主，這樣的判斷結果通常缺乏客觀性，且容易造成人為的誤判。本計劃則利用影像處理的技術，先將腎小管區域分割出來，並以單位面積內腎小管所佔面積的百分比為緻密度的量化數據。再配合病例的統計決定出正常與不正常值的範圍，如此便可提供一個較客觀的度量工具。

觀察腎小管的原始影像(Fig. 5)，發現腎小管為紫色的區域、深紫色為細胞核、淡紫色為腎小管間質、而右下角圓形區域則為腎絲球。由原始影像不難發現腎小管內部與外部的顏色幾乎一樣，都是淡紫色。因此要區別腎小管內部與外部區域必須先將腎小管部位分割出來，再利用空間的相對關係分辨

出內部與外部。雖然腎小管壁為紫色，但是它的顏色並不是很均勻，因此需要多重閾值來進行影像分割。Fig. 6為分割後的影像，有些非腎小管區的部位一被分割出來（如腎小管腎絲球內部），但這並不會影響數據統計的結果。而有一些屬於腎小管部位並沒有被分割出來，原因是因為這些區域的顏色比較淡，若要將此區域也分割出來則會同時把其他非腎小管區也一並分割出來，這會對後續的數據統計造成困擾。

由Fig. 6可以看出，只要適當選擇分割閾值所得的結果以可正確的表示出腎小管管壁的部位，僅有小部份的管壁沒有找出，這會造成後續無法以區域成長法填滿腎小管內部。因此我們提供了交談式工具，由醫師以手動的方式將腎小管補成封閉狀。以區域成長法自動填滿腎小管內部似乎有些困難，因為對如此複雜的幾何圖形很難決定哪些部位是屬於內部。所以在區域成長種子點的選取仍然採用手動的方式給定。Fig. 7顯示標示腎小管內部後的結果。然後，由醫師選擇一個區域，計算期間腎小管內部區域面積的百分比即為該區腎小管的緻密度。以Fig. 7之左半邊為例，緻密度約為70%左右。

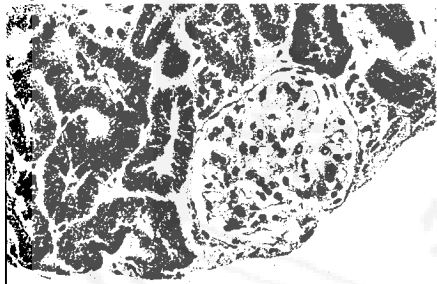


Fig. 5 腎小管原始影像

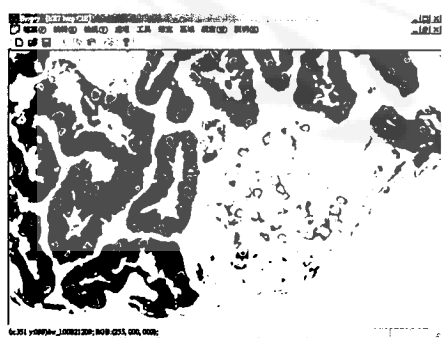


Fig. 6 經 CIE 分割後影像

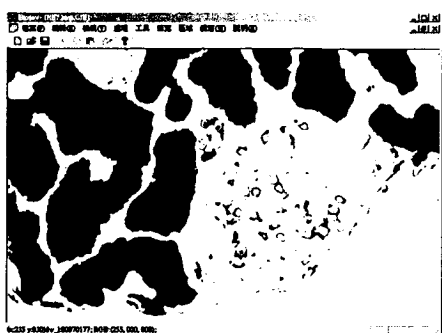


Fig. 7 利用區域成長法標示出腎小管部位

四、計畫成果自評

本計劃的執行期間為半年（89年2月1日至89年7月31日），在這半年內，從無到有建立了一個簡單易用的介面，並提供了兩個簡單的腎切片影像的分析處理功能，讓臨床醫師能實際的做一些數據統計的工作。雖然所完成的內容並不多，而且也還沒有做到完全自動化，但是已經為這複雜的腎切片影像分析工作邁出了一大步。這半年的計劃中所完成的內容大致與原計劃書的內容相符，只是將所用的方法簡化。因為時間緊迫，較複雜的分析方法與自動化處理在這半年的計劃中先行掠過，而在下年度的計劃中將予以完成。

腎切片影像的後續處理與分析的工作還很多，而其複雜度也相當高。這些後續的工作將在往後的計劃中陸續實現。而所開發出來的系統，不但可以應用在腎切片的分析，也可以稍加修改以應用於其他部位切片影像的分析與處理。

五、參考文獻

- [1] J. C. Jennette and R. J. Falk, "Diagnosis and management of glomerular diseases," *Medical Clinics of North America*, Vol. 81, pp. 653, 1997.
- [2] L. Reisman, S. Dikman, J. Churg, and S. Kupfer, "Renal biopsy: why and when," *Mount Sinai J Med.*, Vol. 63, pp. 178, 1996.
- [3] 行政院衛生署：衛生統計 1: 47, 民國八十七年。
- [4] M. M. Schwartz, S. P. Lan, and J. Bernstein *et al.* "Role of pathology indices in the management of severe lupus glomerulonephritis," *Kidney Int.*, Vol. 42, pp. 743, 1992.
- [5] G. E. Striker, L. I. Schainuck, and R. E. Cutler *et al.*, "Structural-functional correlations in renal disease. I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease," *Human Pathol*, Vol. 1, pp. 615, 1970.
- [6] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital image processing*, Addison-Wesley Publishing Company, 1992.
- [7] W. K. Pratt, *Digital image processing*, A Wiley-Interscience Publishing John Wiley & Sons, Inc., 1991.
- [8] Y. N. Sun, M. H. Horng, X. Z. Lin, and J. Y. Wang, "Ultrasonic image analysis for liver diagnosis," *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, pp. 93-101, Nov./Dec. 1996.