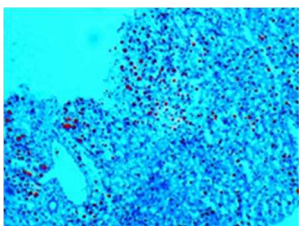



研究代表者	所属学系・職名 生物・農学系・准教授 氏 名 窪田 陽介
研究課題	周産期疾病の要因となるウシ脂肪肝の高精度画像診断システムの開発のための基礎的研究 Basic study on the development of diagnostic system for fatty liver of dairy cows using image processing.
成果の概要	<p>【研究背景および目的】 乳牛における脂肪肝は、分娩前後のエネルギー不足により起こる疾病であり、ケトosisや乳房炎等の周産期疾病を誘引する。近年の品種改良による泌乳量の増加によって分娩時期のエネルギー不足も大きくなり、乳牛が脂肪肝を罹患する可能性が高くなっているため、適切な脂肪肝診断と治療が必要とされている。</p> <p>ウシ脂肪肝の診断は、血液や超音波を用いて診断する手法が挙げられるが、確定診断には生検針を用いて採取した肝臓切片を生化学的または組織学的に分析し診断する、肝生検による診断が用いられる。組織学的診断では、獣医師が顕微鏡を用いて脂肪量を測定する生体組織診断が行われるが、この方法は再現性に課題があり、また詳細な数値データを得ることが困難である。そこで本研究では、獣医師の診断に代わり、肝臓切片画像に対し画像処理を行うことで脂肪滴の特徴を数値データとして抽出し、統計解析により脂肪肝を診断する「ウシ脂肪肝の画像診断システムの開発」を目的とする。</p> <p>【実験材料および方法】 実験材料 淡路農業技術センター飼養の乳牛28頭から肝生検により肝臓組織切片を122検体採取した。全ての肝臓組織切片に対し固定処理および脂肪の染色処理を行い、その後プレパラートへ封入することで肝臓切片サンプルを作成した。作成した肝臓切片サンプルに対し、光学顕微鏡GC号(Olympus)およびCCDカメラCU-2500s(顕微鏡屋)を用いて撮影を行い(倍率200倍)、肝臓切片画像を取得した(解像度:2592×1944)。サンプルごとに撮影領域を変えて6回の撮影を行い、732画像を取得した(図1)。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>図1 肝臓切片画像</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>図2 脂肪滴抽出画像</p> </div> </div> <p>画像処理アルゴリズム 乳牛の脂肪肝診断のための画像処理アルゴリズムをMATLAB R2016b(Math works)を用いて構築した。肝臓切片画像に対し、グレースケール変換、輝度閾値による2値化処理等を実施し、肝臓組織面積を出力した(図2)。また、色相成分画像を作成し、輝度閾値による脂肪滴の有無の判定を行った。脂肪滴の沈着が認められる画像に対しては、輝度閾値による2値化処理、膨張収縮処理、結合脂肪滴の分割処理を行い、脂肪滴の面積および個数を出力した。出力した脂肪滴面積と肝臓</p>

組織面積から脂肪滴の被覆面積率を、また脂肪滴面積と個数から脂肪滴の平均面積を算出した。その後、作成したグレースケール画像および色相成分画像を2行3列の配置で6分割する処理を行った。各領域における脂肪滴の被覆面積率を計算しその最大値を脂肪滴の偏り度とした。

ウシ脂肪肝診断の基準

罹患程度別に脂肪肝を以下に示す5段階の診断Lv.に分類した。

- ・Lv.0：脂肪滴の沈着が認められない
- ・Lv.1：極微小の脂肪滴の沈着が認められる
- ・Lv.2：肝静脈周辺に脂肪滴の偏在が認められる
- ・Lv.3：全体に小さな脂肪滴の沈着が認められる
- ・Lv.4：全体に大きな脂肪滴の沈着が認められる

以上を診断の基準として、3名の獣医師による肝臓切片サンプルおよび画像の目視診断を行った。3名の見解がまったく一致しないものは診断Lv.の確定が困難なため取り除き(5サンプル、1画像)、その他の画像では診断結果をその画像の診断Lv.とした。

【結果および考察】

画像処理による出力変数

画像処理により、肝臓切片画像から脂肪滴の被覆面積率、個数、平均面積、偏り度を出力した。脂肪滴の偏り度については、脂肪滴の個数が少ないLv.1、Lv.2では高い値を示し、脂肪滴が均一に沈着するLv.3、Lv.4では低くなることから、軽度の脂肪肝の判別において、脂肪滴の偏り度は有効な指標であると考えられる(図3)。脂肪滴の被覆面積率および個数では、診断Lv.に比例して値が増加する傾向が認められた。脂肪滴の平均面積も同傾向を示し、Lv.4では顕著な増加が確認された。

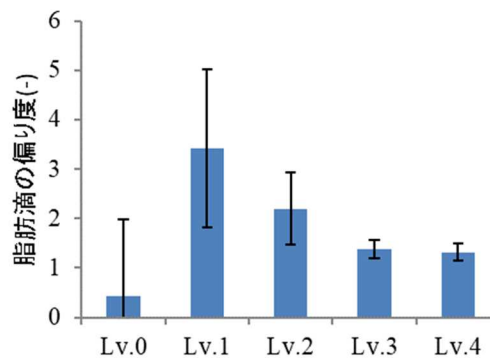


図3 診断Lv.ごとの脂肪滴の偏り度

エラーバー：標準偏差

**：Welchの検定で有意差(5%)

肝臓切片画像の診断Lv.判別

肝臓切片画像の判別では、Lv.0～Lv.4の5段階診断をNormal群(Lv.0)、Middle群(Lv.1、Lv.2)、Serious群(Lv.3、Lv.4)の3群に分配し、未知画像の群判別、および群内での診断Lv.判別をマハラノビス距離による判別分析を用いて行った。

3群の判別では、説明変数を脂肪滴の被覆面積率、個数、偏り度とした。モデル用画像は各診断Lv.から6画像ずつ計30画像を使用し、残りの731画像を未知画

像として、作成した判別モデルに投入し3群の判別を行った。その後、Middle群およびSerious群で診断Lv.の判別を行った。その際、Serious群では脂肪滴の被覆面積率、個数、平均面積を説明変数として用いた。モデル画像は12画像を使用し、画像の診断Lv.を判別した。作成した3つの判別モデルにより未知画像の診断Lv.判別率は86.8%であった。

肝臓切片サンプルの診断Lv.推定

肝臓切片サンプルの診断Lv.推定結果を表1に示す。肝臓切片画像の診断Lv.判別および診断Lv.推定ルールにより、肝臓切片サンプルの診断Lv.を推定した結果、正診率は86.0%となった。

表1 肝臓切片サンプルの診断Lv.推定結果

診断Lv. \ 推定Lv.	Lv.0	Lv.1	Lv.2	Lv.3	Lv.4	正診率
Lv.0 (n=66)	58	7	1	0	0	87.9%
Lv.1 (n=16)	0	16	0	0	0	100%
Lv.2 (n=22)	0	3	17	2	0	77.3%
Lv.3 (n=11)	0	0	2	7	2	63.6%
Lv.4 (n=2)	0	0	0	0	2	100%
n=サンプル数						86.0%

【まとめ】

本研究で構築した画像処理アルゴリズムおよび判別分析を用いた画像診断システムにより周産期疾病を誘引するウシ脂肪肝における診断Lv.を86.0%で推定することを実現した。