

血液形態検査におけるデジタル標本の有用性と活用法について

三ツ橋 雄之

慶應義塾大学医学部 臨床検査医学：東京都新宿区信濃町 35（〒160-8582）

SUMMARY

デジタル標本とは、コンピュータ上で観察できる塗抹標本のデジタル画像である。顕微鏡で連続的に撮影し、それらを画像的に張り合わせることで、切れ目のない広大な視野の標本デジタル画像を実現している。デジタル標本は標本スライドに匹敵する細胞形態の情報を有するため、その情報を様々な環境で利用することが可能となる。これまで血液形態検査精度管理サーベイや症例カンファレンスに活用され、有用性が高く評価されている。

Key Words デジタル標本, 血液形態, 遠隔血液診断

はじめに

デジタル標本とは、顕微鏡で観察する標本スライドをコンピュータ画面上で観察できるように画像化したものである。顕微鏡写真とは異なり、デジタル標本では標本スライドの広い範囲を連続的に画像化するため、顕微鏡観察と同様に視野を自由に移動して観察することができ、特定の視野を撮影した顕微鏡写真と比べて、標本に近い観察所見を得ることが可能である。また、観察倍率を変更して強拡大視野における細胞の詳細な観察を行うこともできる。そのため、標本上の特徴的な視野や所見を確認するために用いるだけでなく、デジタル標本を標本スライドのように観察して、細胞の分類や疾患の診断を行うことも可能である。デジタル標本のように標本を観察環境も含めて画像化したものはバーチャルスライドとも呼ばれ、病理検査の分野ではすでに利用されるようになってきているが、血液形態検査での利用はまだ少ない。慶應義塾大学医学部中央臨床検査部ではシスメックス社との共同研究として遠隔血液

診断支援システムの開発を行った際に、遠隔診断における血液細胞の観察環境としてデジタル標本が最適であると考え、デジタル標本の作成装置と観察環境の開発を進め、デジタル標本作成サービスとして血液形態検査での利用が可能なデジタル標本の作成装置および観察用プログラムを構築した。デジタル標本には遠隔血液診断支援のほかにも様々な用途での利用方法が考えられ、有用性が高いツールと思われる。

デジタル標本とはどのようなものか

デジタル標本は標本スライドをコンピュータ画面上で観察できるように画像化するとともに、標本の観察環境を同時に再現したものである。専用に開発したデジタル標本作成装置を用いて標本スライドの顕微鏡写真を連続的に撮影し、それらを画像的に張り合わせることで、切れ目のない広大な視野の顕微鏡画像が得られる。この広視野の顕微鏡視野画像を

標本上の位置を示す情報とともに管理し、コンピュータ画面に視野操作に対応した画像を表示することにより、標本の観察環境を再現する。血液形態検査で用いる血液塗抹標本（末梢血塗抹標本あるいは骨髓塗抹標本）は、一般的な病理標本に比べて観察範囲が広く、また個々の細胞形態を評価するために100倍の油浸対物レンズを用いて観察する必要がある。デジタル標本作成装置ではこのような観察環境を再現するために、精度の高い自動ステージと高性能の油浸対物レンズを用いて撮像を行う。本来であれば標本の全視野を画像化することが望まれるが、現在の装置やコンピュータの処理速度ではデジタル標本の作成にかかる時間が非常に長くなるため、現段階では標本上の所見を正しく評価するために必要と考えられる限られた領域に限定して画像化を行っている。血液塗抹標本での細胞形態の観察に適する標本の引き終わり近くの領域に100倍の油浸対物レンズを用いて撮影する高解像度の視野を設定し、骨髓塗抹標本ではさらにその周辺および標本の辺縁部や塗抹の引き終わり部分をカバーする領域を、20倍の油浸対物レンズにて広視野領域として、合わせて撮影している（図1）。デジタル標本の観察時にはこれらの視野を必要に応じて切り替えて観察する。デジタル標本の観察時の表示画面には観察視野の画像を表示するウィンドウを中心として、標本スライドの写真に現在観察中の視野の位置が表示されるナビゲーター、観察倍率の変更やその他の機能を使用す

るために用いるボタンが表示されたウィンドウなどが表示される。観察視野の移動にはコンピュータのマウスのホイールを用い、ホイールを回転させることで連続的な視野移動が可能である。これらの画面および操作系の組み合わせにより、顕微鏡と同様の感覚で操作が可能なデジタル標本の観察環境がコンピュータ上に構築される（図2）。

デジタル標本の開発背景

デジタル標本作成サービスで提供されるデジタル標本の開発は、前述の遠隔血液診断支援システムの開発過程で開始されたものである。遠隔血液診断支援システムは、コンピュータネットワーク等を利用した血液疾患の診断支援システムとして考えられたものであり、血液形態検査の診断補助を主たる目的としている。血液疾患の診断には臨床検査の果たす役割が非常に大きく、末梢血および骨髓中の細胞形態の評価、細胞表面マーカー検査、遺伝子検査、染色体検査などの臨床検査の結果を臨床所見とともに総合的に判断して診断や治療経過の評価が行われる。これらの臨床検査の中でも末梢血および骨髓の形態学的検査の役割は現在でも非常に大きく、診断の中心的な役割を果たしているといえる。しかし、形態学的検査には細胞形態に関する知識とともにある程度の経験が必要とされるため、必ずしもすべての臨床医が適切な判断を下せるとは限らず、専門などによる

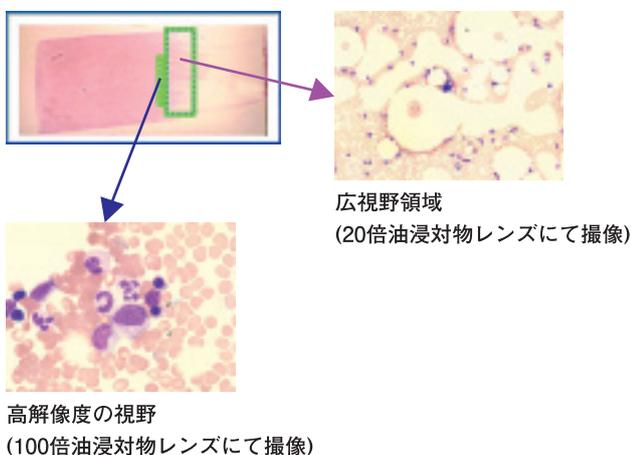


図1. デジタル標本の撮像領域

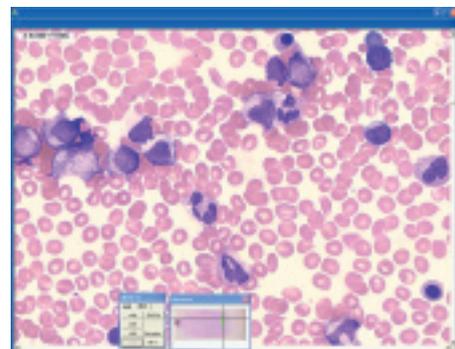


図2. デジタル標本の観察画面

診断支援が必要となることが少なくない。しかし、実際の血液診療の現場では血液専門医の数は多くはなく、また血液形態検査に熟練した臨床検査技師や臨床検査医の数も十分ではないため、必要なときに専門家の助言や診断支援を受けられない状況にあることが懸念されていた。遠隔血液診断支援システムは、ネットワーク経由で形態学的診断を行うことでこのような状況を改善することを目標として開発が進められた。診断支援には血液細胞形態の情報が必須であるにも関わらず、標本そのもののやり取りには手間と時間がかかり、また顕微鏡写真では情報量が不足することが明らかとなったため、遠隔血液診断支援システムではデジタル標本を採用することとした。しかし、血液塗抹標本は観察範囲が広いことに加えて、細胞形態の詳細な観察のために100倍の油浸対物レンズを用いて画像を撮影することが要求されるため、血液塗抹標本からのデジタル標本の作成には非常に精度の高い撮像用の装置が必要となり、新たに専用のデジタル標本作成装置と観察用プログラムの開発を行った。デジタル標本を用いた遠隔血液診断支援システムは現在のところ実際に運用されるシステムにはなっていないが、基幹部分であるデジタル標本は遠隔血液診断支援の用途以外にも様々な活用が可能と考えられたため、観察用プログラムの改善などを実施し、有用性の評価を継続して行ってきた。

デジタル標本の作成と観察環境

デジタル標本の作成には、専用開発されたデジタル標本作成装置が用いられる。デジタル標本作成装置の基本的な構成は焦点調整機構を加えた顕微鏡ユニットにCCDカメラと自動移動ステージを取り付けたものであり、これに顕微鏡のコントロールや画像処理を行うコンピュータが組み合わされている。顕微鏡の対物レンズには100倍および20倍の油浸対物レンズを用い、強拡大の高解像視野の撮影は画質を優先して100倍の対物レンズで、弱拡大の広視野領域の撮影は画質と作業効率を両立させるため20倍の対物レンズで行っている。デジタル標本作成の際には顕微鏡の視野を若干の重なり部分を残しながら移動させて連続して撮影し、重なり部分をもとに画像のつなぎ合わせを行うことにより広い視野領域にわたって切れ目のない画像を作成する（画像タイリング）（図3）。また焦点を少しずつ変えて撮影した複数枚の画像をもとに撮像画素単位で焦点の判別を行い、画像上の焦点の合った部分を抽出して視野全体に焦点の合った1枚の画像に合成する（フォーカス合成）（図4）。これらの画像処理技術の組み合わせにより、非常に広い範囲の視野を連続的に観察でき、視野全面に焦点の合った高精細の顕微鏡視野画像が作成される。

隣り合う画像を合成

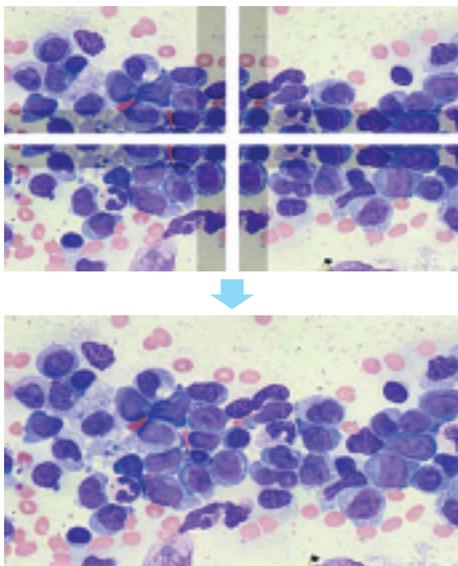


図3. 画像タイリング

異なる焦点位置で撮像した画像を合成

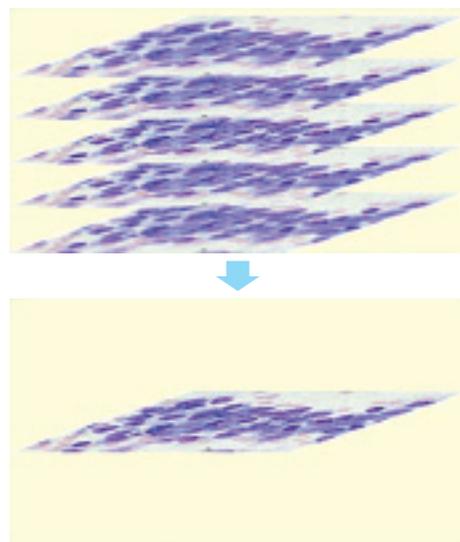


図4. フォーカス合成

デジタル標本作成装置によって作成されたデジタル標本は、専用の観察用プログラムを用いて観察する。デジタル標本には非常に広い視野領域の画像が記録されているが、観察用のコンピュータ画面に表示される視野はそのごく一部分であり、画像とともに記録される位置情報を用いて、視野移動操作に応じた画面を表示する。観察用プログラムの操作にはコンピュータのマウスを用いるが、顕微鏡ステージのハンドルをマウスのホイールに見立て、ホイールの操作により連続的な視野移動が可能である。顕微鏡と異なり、通常のマウスではホイールは1つであるため、ホイールをクリックすることにより移動方向の縦と横の切り替えを行う。これによりXYステージの操作とほぼ同様の感覚での視野移動が可能となり、スムーズな観察を行うことができる。倍率の変更は強拡大視野で4段階(100倍～600倍)、弱拡大視野で2段階(100倍～200倍)に変更可能であり、強拡大視野の最高倍率は顕微鏡観察における600倍にほぼ相当する設定であるが、強拡大視野は100倍の油浸対物レンズにより撮影された画像であり、顕微鏡観察における合計倍率1,000倍の視野と同等の解像度が実現されている。観察用プログラムには基本的な標本観察の機能を有するもののほか、精度管理サーベイなどに利用可能な細胞の分類カウント機能を有するものや(図5)、症例提示などを想定して視野の自動移動を設定することができる機能を有するもの(図6)などが用意されている。

デジタル標本の実用的性能

デジタル標本の画質や操作性については開発の初期から現在まで様々な改良が行われているが、デジタル

標本に関する基本的要件は遠隔血液診断支援システムの開発段階で決定したものを踏襲しており、基本的な画質や操作性は遠隔診断支援システムの一部として作成されたものと大きくは変更されていない。遠隔血液診断支援システムの開発時に実施した有用性評価では、慶應義塾大学病院に勤務する血液内科医6人にデジタル標本による標本観察を軸とした遠隔診断を実施するシミュレーションに参加してもらい、デジタル標本の画質や有用性の評価とともにデジタル標本を用いた遠隔血液診断の実現可能性について評価と聞き取り調査を行った。その結果、血液疾患8症例(慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病(3例(M2, M3, M4)), 急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫)について臨床検査データとデジタル標本の観察により診断を行う実験にて、6人全員がすべての症例で適正な診断名を回答し、遠隔診断支援システムによって遠隔診断を実施することが十分に可能であるとの評価がなされた。さらに、シミュレーションの終了後に行った聞き取り調査においても、「使用したデジタル標本の画質であればほとんどの事例で遠隔診断による診断報告をすることができると考えられる」など肯定的な回答が6人全員から得られたほか、「自由な姿勢で観察できるため顕微鏡観察よりも負担が少ないと感じる」などの意見も寄せられ、デジタル標本が実用上十分な画質や操作性を持っていることが示唆された。デジタル標本作成サービスで用いられるデジタル標本はこの検討の時点よりも画質や操作性の向上が図られており、標本の観察のみならず、デジタル標本を用いた診断や症例検討の実施も可能な水準にあるものと考えられる。

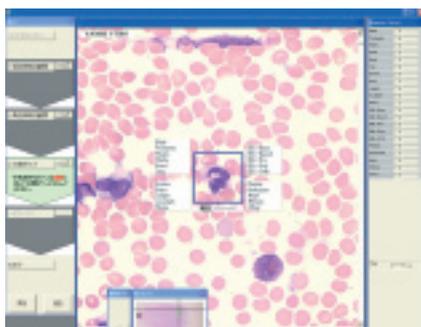


図5. 分類カウント機能画面

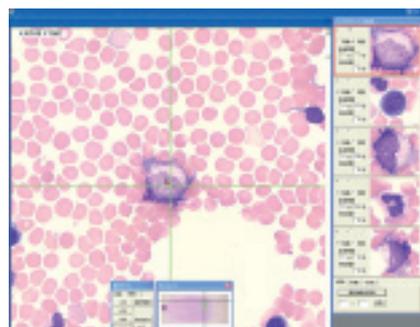


図6. 視野の自動移動設定画面

デジタル標本の有用性と活用法

デジタル標本は標本スライドに匹敵する細胞形態の情報を有する画像ファイルであり、顕微鏡写真のように特徴的な所見を示す視野の画像を記録する目的としてだけではなく、デジタル標本そのものを観察して所見を評価し、形態学的な判断や疾患の診断に用いることができる可能性があると考えられる。現在は標本スライドの全視野を画像化したデジタル標本の作成には非常に時間がかかり、また画像データとしてのサイズも非常に大きくなるため、デジタル標本作成サービスでは標本上の一部の視野のみを画像化したデジタル標本が提供されることになるが、デジタル標本の有用性は現状でも十分に生かすことができると考えられる。

また、従来は標本スライドと顕微鏡が揃う環境でしか利用できなかった細胞形態の情報を様々な環境で利用することも可能となる。外来や病棟などの診療の現場には顕微鏡がないことも多く、異常細胞についての報告を受けても実際に確認するには検査室まで出向かなくてはならなかったものと思われるが、デジタル標本であればそれらの診療の現場だけでなく、研究室やカンファレンスルームなど様々な場所でも細胞形態の情報を直接的に利用することが容易に可能となる。また、これまでは顕微鏡写真を用いることが一般的であった教科書、症例アトラスのような書籍や学生教育に用いるスライドなどにデジタル標本を利用することによって、実際の標本スライドを提示するのと同様の内容を盛り込むことができるようになり、教育的効果の向上も期待される。さらにデジタル標本は破損や褪色の心配がなく、標本スライドに比べて保管場所の問題も少ないため、従来は困難であった長期間にわたる症例の蓄積や、非常に多くの症例を集積したデータベースの作成なども可能と思われる。デジタル標本の特徴を生かした活用方法としてはこのほかにも様々なものが考えられるが、これまでに我々が実施してきたデジタル標本の活用法として有用性が高いと考えられた事例について、以下に概要を示す。

1. 血液形態検査精度管理サーベイでの利用

血液形態検査の精度管理サーベイでは、サーベイの手法として、1) 血液塗抹標本を配布して分類カウントの実施や所見の評価を行う方法、あるいは2) 血液細胞の顕微鏡写真を配布して細胞を判別させる方法の2つの方法が一般的である。しかし、前者の方法では適切な塗抹標本を数多く準備することが困難であることに加えて標本ごとの差異もあり、正確な相互比較が難しいことなどが問題であり、後者では細胞判別技能の評価はできるものの、実際の検査手技を評価できていない可能性があることなどが問題であると思われる。デジタル標本による精度管理サーベイでは、参加者にデジタル標本を配布し、観察用プログラムの細胞分類の機能を用いてデジタル標本上の評価対象細胞を日常の検査と同様に分類してもらい、その結果をもとに評価を行う。これにより、サーベイ参加者が細胞をどのように分類したか客観的に比較することができ、実際の検査技術や知識を正しく評価することが可能となった。デジタル標本を用いた精度管理サーベイは、すでにいくつかの精度管理プログラムで採用され、有用性が高く評価されている。

2. 症例カンファレンスでの利用

デジタル標本を用いたカンファレンスとしては、日本検査血液学会学術集会における症例カンファレンスが例としてあげられる。日本検査血液学会の学術集会では例年、症例を提示して形態学的所見についてディスカッションを行う症例カンファレンスが実施されているが、症例の細胞形態所見をデジタル標本にて提示し、細胞形態の評価や診断の進め方などについての議論が交わされる。症例提示の手段として顕微鏡写真ではなくデジタル標本を用いることにより、カンファレンスの参加者全員が標本の所見を会場で十分に確認することができ、ディスカッション顕微鏡を用いて標本を観察しながら議論を行うような密度の高いカンファレンスを、大きな会場で多人数の参加のもとに実施することが可能となった。

デジタル標本に期待すること

血液形態検査におけるデジタル標本の利用は、顕微鏡による標本観察を顕微鏡のない環境でも実施できるようにすることで、血液形態検査による様々な情報をこれまでよりも自由に、場所や時間の制限なく利用できるようにするものであり、血液形態検査を新しい視点でより積極的に活用することができるツールとなる

ものと思われる。顕微鏡による塗抹標本の観察が血液疾患の診断に果たす役割の重要性が変わることはないが、塗抹標本が顕微鏡から解放されることにより、血液形態検査の所見がこれまでよりも有効に活用され、血液疾患をはじめとした様々な疾患の診療や研究にさらに役立つものとなることが期待される。

Application of Digital Slide to Blood Morphology Tests and its Usefulness

Takayuki MITSUHASHI

Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582

SUMMARY

Digital slide is a processed digital image for observation of a smear specimen on a computer screen. The digital images are taken serially with a microscope. And then, these images are processed to yield a wide continuous visual field without break. The digital slide has morphology information which is equivalent to that of a specimen slide. So it is possible to use it for various purposes. It is used for a control survey for blood morphology and a case conference, and has been highly valued on its usefulness.

Key Words Digital Slide, Blood Morphology, Telehematology