

Segmentierung von überlappenden Zellen in Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen

Matthias Grobe, Heiko Volk, Christian Münzenmayer und Thomas Wittenberg

Fraunhofer-Institut für Integrierte Schaltungen, 91058 Erlangen
Email: grobems@iis.fhg.de

Zusammenfassung. Dieser Beitrag beschreibt die Segmentierung von Zellen aus zervikalen Abstrichen. Als Bildmaterial werden von einem Mikroskop aufgenommene, hochauflösende, registrierte Bildpaare verwendet, die jeweils aus einem Durchlichtbild und einem Fluoreszenzbild bestehen. Die Segmentierung der Zellplasmen erfolgt im Durchlichtbild, die der Zellkerne im Fluoreszenzbild, wobei jeweils histogrammbasierte Verfahren eingesetzt werden. Es werden sowohl einzeln liegende Zellen als auch sich überlappende Zellen segmentiert. Diese Zellaggregate werden anschließend getrennt, um jeweils einen einzelnen Zellkern mit seinem dazugehörigen Zellplasma zu erhalten. Während dieser Trennung werden die Überlappungen der verschiedenen Zellplasmen lokalisiert und berücksichtigt.

1 Problemstellung

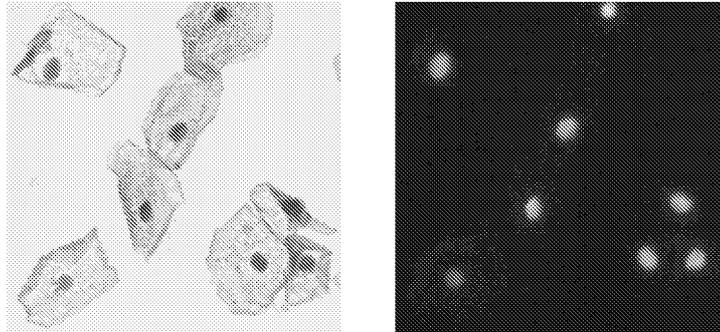
Im Rahmen der Krebsfrüherkennung bei Frauen werden zervikale Abstriche mit dem Verfahren nach Papanicolaou (PAP-FärbungTM) aufbereitet, sodass Zellen mikroskopisch betrachtet und auf Veränderungen durch Krebs untersucht werden können. Um diese äußerst aufwändige manuelle Prozedur zu automatisieren können die angefärbten Proben digitalisiert und durch einen Computer vorverarbeitet werden. Für eine computergestützte Klassifikation der Probe anhand der einzelnen Zellen müssen diese segmentiert werden.

2 Stand der Forschung

Um Zellen computergestützt zu klassifizieren, werden die Zellkerne in PAP-gefärbten Durchlichtbildern segmentiert und auf diesen morphologische sowie Texturmerkmale berechnet [1,2]. Da hierbei die Segmentierung des zugehörigen Zellplasmas nicht durchgeführt wird, wird damit jedoch das nach zytologischen Gesichtspunkten wichtige Verhältnis zwischen Zellkernfläche und Zellplasmafläche außer Acht gelassen.

Es existieren mittlerweile Algorithmen [3,4], die auch oder ausschließlich das Zellplasma segmentieren. Diese basieren aber überwiegend auf unvollständigen Segmentierungen, die das allgegenwärtige Problem der Überlagerung der Zellen ignorieren oder nur unzureichend behandeln. Manche Ansätze [5] gehen davon

Abb. 1. Ausschnitt eines registrierten Bildpaares: links PAP-gefärbtes Durchlichtbild (gemittelte Grauwerte des RGB-Originalbildes), rechts DAPI-gefärbtes Fluoreszenzbild (blauer Farbkanal des RGB-Originalbildes)



aus, dass gegenseitige Überlagerungen nicht vorkommen - eine Gegebenheit, die bei einer effizienten Aufbereitung der Abstriche fast unmöglich zu erreichen ist. Andere Verfahren [6] segmentieren Zellen bzw. Zellkerne und können zudem mögliche Überlagerungen entdecken, behandeln diese überlappenden Zellen jedoch nicht weiter und schließen sie dadurch von der Klassifikation aus.

3 Wesentlicher Fortschritt durch den Beitrag

Im Gegensatz zu anderen Verfahren wird für den vorgestellten Ansatz die Verarbeitung der Abstriche erweitert: Neben der originären PAP-Färbung wird eine Probe zudem durch eine sog. DAPI-Fluoreszenzfärbung aufbereitet und unter UV-Beleuchtung aufgenommen. Wegen dieser Doppelfärbung stehen registrierte Bildpaare der Probe zu Verfügung, d.h. jeweils eine PAP-gefärbte Durchlicht- und eine DAPI-gefärbte Fluoreszenzaufnahme (siehe Abb. 1).

Neben der Segmentierung des Zellkerns und des Zellplasmas von frei liegenden Zellen beschäftigt sich dieser Beitrag speziell mit der Behandlung von sich gegenseitig überlappenden Zellen. Es wird angestrebt, aus jenen Zellaggregaten eine möglichst große Anzahl Zellen herauszutrennen, um damit idealerweise viele einzelne Zellen pro Probe zu erhalten. Eine segmentierte Zelle besteht jeweils aus einem Paar von (einschlußfreien) Binärmasken für den Zellkern und das Zellplasma. Aus diesen Flächenpaaren lässt sich u.a. auch das Kern-Plasma-Verhältnis berechnen.

4 Methoden

Die Segmentierung von Zellen beginnt mit den Zellplasmen im PAP-gefärbten Durchlichtbild. Hierfür wird ein Grauwert histogramm des Bildes erstellt, aus dem mit dem Verfahren der bimodalen Entropie [7] ein Schwellwert berechnet werden kann. Dieser liegt zwischen den charakteristischen Ansammlungen der

Grauwerte der Zellen und des Hintergrundes. Anschließend wird das Bild mit dem Schwellwert binarisiert und die einzelnen Regionen darin separiert. Nach einer Säuberung der Binärmasken von Einschlüssen repräsentieren diese die Plasmen einzelner Zellen oder ungetrennter Zellaggregate.

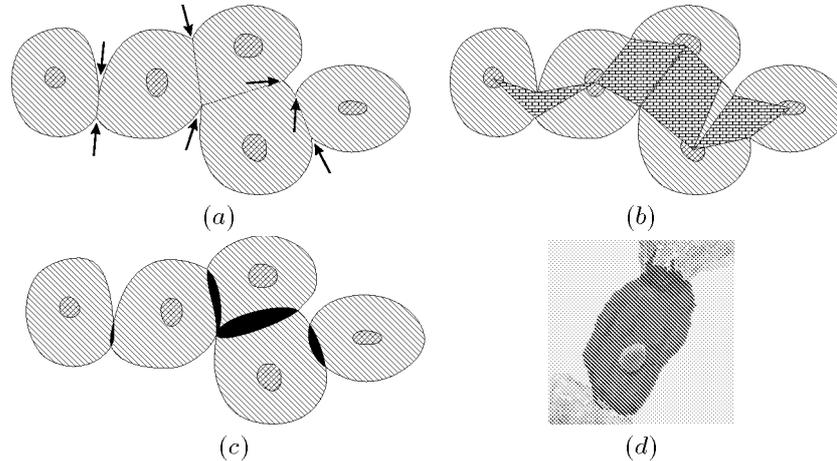
Nun wird das DAPI-gefärbte Fluoreszenzbild betrachtet: Aus dem blauen Farbkanal des Bildes wird ein Grauwert histogramm generiert und mithilfe der bimodalen Entropie ein Schwellwert berechnet. Mit diesem lässt sich das Bild binarisieren, um Hypothesen für Zellkerne zu finden. Diese Hypothesen umfassen einen oder mehrere Zellkerne sowie einen geringen, umgebenden Bereich. Bei der Betrachtung jeder einzelnen Hypothese wird ein lokales Grauwert histogramm erstellt, aus dem sich wiederum ein lokaler Schwellwert berechnen lässt. Mit diesem kann der Bereich innerhalb der Hypothese in echte Zellkerne und den Hintergrund binarisieren werden. Auch hierbei findet eine Säuberung der Binärmasken von Einschlüssen statt.

Anschließend werden die Zellkernflächen den Zellplasmaflächen zugeordnet. Alle Zellaggregate, die pro Zellplasmafläche mehr als eine Zellkernfläche beinhalten, werden auf ihre mögliche Teilbarkeit hin untersucht. Als Kriterien werden dabei die Abstände der Zellkernschwerpunkte und deren geometrische Lage zueinander verwendet. Wenn ein Zellplasma teilbar erscheint, wird für dieses zuerst ein Grobschnitt mit geraden Schnittkanten berechnet, um eine Grundfläche für das Plasma zu erhalten. Diese Schnitte verlaufen zwischen je zwei sog. "Einschnürungspunkten" (siehe Abb. 2a). Diese Punkte bestimmen die kürzeste Verbindung zwischen dem "linken" und "rechten" Zellplasmamrand des Zellaggregates zwischen jeweils zwei Zellkernen. Zur Verbesserung des Grobschnittes wird der Bereich einer möglichen Überlappung des Zellplasmas definiert: dieser umfasst eine Raute zwischen den Zellkernschwerpunkten und den "Einschnürungspunkten" (siehe Abb. 2b). Innerhalb dieser Raute wird ein lokales Grauwert histogramm des PAP-gefärbten Durchlichtbildes erstellt und mittels des Verfahrens nach Otsu [8] ein Schwellwert berechnet. Diese Vorgehensweise basiert auf der Annahme, dass das angefärbte Zellplasma auf dem Bild dunkler erscheint als der weiße Hintergrund und dass zwei oder mehr überlappende Zellplasmen aufgrund ihrer "additiven Transparenz" nochmals dunkler erscheinen. Mit dem Schwellwert wird der Bereich innerhalb der Raute (abzüglich der Flächen der Zellkerne) binarisiert und die Ränder durch die Entfernung von Einschlüssen gesäubert. Die gewonnene Fläche, welche die Überlappung der beiden Zellplasmen der zwei Zellen darstellt (siehe Abb. 2c), wird beiden Grobschnitten der herauszutrennenden Zellplasmen hinzugefügt. Alle herausgetrennten Zellen inkl. einem Kern und einem Zellplasma werden als Ergebnis zurückgegeben.

5 Ergebnisse

Um die automatische Segmentierung bewerten zu können, wurde ein Satz von 271 Zellbildpaaren herangezogen und manuell (von einer Person) sowie automatisch segmentiert (Daten siehe Tab. 1). Hierbei wurde der überwiegende Teil der Zellen (76 %) aus der Handsegmentierung wiedergefunden, wobei erwähnt

Abb. 2. (a) Zellaggregat mit sich überlappenden Zellplasmen (schraffiert), Zellkernen (kariert), Einschnürungspunkten (Pfeile) und den Grobschnitten der Zellplasmentrennung (gestrichelte Linien); (b) Bereiche möglicher Überlappungen der Zellplasmen (Ziegelschraffur); (c) Segmentierte Überlappungen der Zellplasmen (schwarz); (d) Beispiel einer segmentierten Zelle aus Abb. 1



werden muss, dass bei beiden Segmentierungen nicht vollständig alle Zellen der Aufnahmen segmentiert wurden. Die segmentierende Person wie der Algorithmus ließen “unmarkierbare” bzw. “untrennbare” bzw. “ungültige”, da am Bildrand liegende, Zellen außer Acht, wobei diese beiden Mengen aber unterschiedlich waren.

Anschließend wurden die von beiden Segmentierungen markierten bzw. gefundenen Zellen miteinander verglichen. Hauptsächliche Kriterien waren die Abstände der Schwerpunkte der Zellkernflächen und die Größe der Kern- und Plasmaflächen. Bei einer durchschnittlichen Fläche der Zellkerne von 876 Pixel beträgt der mittlere Abstand der Schwerpunkte zwischen manueller und automatische Segmentierung lediglich 1,26 Pixel. Der mittlere Unterschied der Flächen beträgt bei den Zellkernen 166 Pixel und bei den Zellplasmen 1491 Pixel, wobei die Zellplasmen im Durchschnitt 18637 Pixel groß sind.

6 Diskussion

Die Experimente zeigen, dass der vorgeschlagene Algorithmus eine genügend große und damit sinnvolle Menge der Zellen segmentieren kann. Einzeln liegende Zellen werden im Vergleich zur Handsegmentierung fast perfekt gefunden und sich überlappende Zellen werden ausreichend gut aus den Zellaggregaten herausgetrennt, sofern es sich nur um 2 bis 3 gleichzeitige Überlappungen handelt. Bei höheren Überlappungen haben selbst ausgebildete Fachkräfte Schwierigkeiten, eine korrekte Trennung der Plasmen vorzunehmen.

Tabelle 1. Daten und Ergebnisse

| | |
|--|---------------------------------------|
| Segmentierte Bildpaare | 271 |
| Größe der Bilder | 1000 x 700 Pixel |
| Fläche eines Pixels | 0,52 x 0,52 μm |
| Zellen in manueller Segmentierung | 1665 |
| Zellen in automatischer Segm. | 1973 |
| Wiedergefundene Zellen | 1263 (76 %) |
| Nicht autom. gefundene Zellen | 402 |
| Zu viel autom. gefundene Zellen | 710 |
| ϕ Fläche Kerne man. Segm. | 873 Pixel (σ 252) |
| ϕ Kernfläche zu viel/zu wenig in autom. Segm. | 21/145 Pixel (σ 36/86) |
| ϕ Zellkernabstand man./autom. Segm. | 1,26 Pixel (σ 0,79) |
| ϕ Fläche Plasmen man. Segm. | 18637 Pixel (σ 6835) |
| ϕ Plasmafläche zu viel/zu wenig in autom. Segm. | 1378/1113 Pixel (σ 2446/1657) |

Im Detail lässt sich sagen, dass die Flächen der Zellkerne und die Abstände der Schwerpunkte der Zellkerne kaum von der Handsegmentierung abweichen: Die Größen der einzelnen Vergleiche liegen in einem sinnvollen Rahmen und damit auch das o.g. Kern-Plasma-Flächenverhältnis.

Ein weiterer Grund für die ausreichende Genauigkeit der Segmentierung ist der Vergleich mit der Schwankung innerhalb der manuellen Segmentierung: in einem Experiment wurde ein kleiner Satz Bilder von ein und derselben Person an verschiedenen Tagen mehrfach segmentiert (5 Bildpaare, darin insgesamt 40 segmentierte Zellen). Hierbei zeigten sich Abweichungen der segmentierten Flächen, welche in der Größe in etwa dem Unterschied zwischen manueller und automatischer Segmentierung entsprachen.

Literaturverzeichnis

1. Dörrer R, Fischer J, Greiner W et al. Ein lernendes System zur Zellbildanalyse. Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart. Stuttgart, 1987.
2. Dörrer R, Fischer J, Schlipf W et al. FAZYTAN Labortest Abschlußbericht. Institut für Physikalische Elektronik, Universität Stuttgart. Stuttgart, 1989.
3. Bamford P, Lovell B: A Water immersion algorithm for cytological image segmentation. Proc of Segment 96, Sydney, 1996.
4. Wu K, Gauthier D, Levine M: Live Cell Image Segmentation. Center for Intelligent Machines, McGill University. Montreal, 1995.
5. Byriel J: Neuro-Fuzzy Classification of Cells in Cervical Smears. Dept. of Automation, Technical University of Denmark Lyngby, 1999.
6. Jarkrans T: Algorithms for Cell Image Analysis in Cytology and Pathology. Faculty of Science and Technology, Uppsala University. Uppsala, 1996.
7. Paulus D, Hornegger, J: Pattern Recognition of Images and Speech in C++. Advanced Studies in Computer Science. Vieweg, Braunschweig, 1997.
8. Lehmann T, Oberschelp W, Pelikan E, Repges R: Bildverarbeitung für die Medizin. Springer, Berlin, 1997.