

Chromatinmuster-basierte Zellklassifizierung für die DNS-Bildzytometrie an Mundschleimhaut-Abstrichen

Timna Schneider¹, André Bell¹, Gerlind Herberich¹, Dietrich Meyer-Ebrecht,¹
Alfred Böcking², Til Aach¹

¹Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen, 52064 Aachen

²Institut für Cythopathologie, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf
Email: timna.schneider@lfb.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Mit zytopathologischen Methoden kann Krebs sehr früh schon anhand geringfügiger Normabweichungen in einzelnen Zellen erkannt werden. Nachteil ist oft der derzeit benötigte Zeitaufwand eines Zytopathologen, der insbesondere einen Einsatz als Screening-Verfahren ausschliesst. Eine wichtige zytologische Diagnosemethode ist die DNS-Bildzytometrie. Um deren Zeitaufwand zu reduzieren, müssen für die Messung relevante Zellen automatisch detektiert werden. Für Epithelien der Mundschleimhaut vergleichen wir daher verschiedene Varianten des k-Nächste-Nachbarn-Klassifikators (kNN), um zwischen sicher gesunden und krebserdächtigen Zellbildern zu unterscheiden. Geeignete Merkmalskombinationen wurden durch das Floating-Search-Verfahren ausgewählt.

1 Einleitung

Die DNS-Bildzytometrie ordnet jeder Zelle als objektive Messgröße ihren DNS-Gehalt zu. Nach dem stöchiometrischen Färben einer Probe nach Feulgen werden dazu die integralen optischen Dichten der Kerne berechnet. Um aus diesen den DNS-Gehalt zu bestimmen, werden zunächst Referenzzellen gesucht. In Abstrichen der Mundschleimhaut sind das gesunde Epithelzellen mit doppeltem Chromosomensatz ($2c$) als DNS-Gehalt. Der DNS-Gehalt der diagnostisch relevanten Analysezellen, also von auffällig veränderten und damit krebserdächtigen Epithelien, läßt sich dann aus dem Verhältnis ihrer optischen Dichten zu der Dichte der Referenzzellen berechnen. Basierend auf einem Histogramm des DNS-Gehaltes der ausgewählten Analysezellen wird schliesslich die Diagnose gestellt.

Die manuelle Selektion von Referenz- und Analysezellen ist zeitaufwändig und sollte durch eine automatische Vorauswahl messrelevanter Zellen unterstützt werden. Dies wird bei Mundschleimhaut-Präparaten dadurch erschwert, dass Referenz- und krebserdächtige Analysezellen nicht aus verschiedenen Zelltypen gewählt werden können, sondern an demselben Zelltyp unterschieden werden müssen. Neben morphologischen Auffälligkeiten ist dabei das Chromatinmuster, d.h. die Textur innerhalb des Zellkerns, von entscheidender Bedeutung.

2 Stand der Forschung

Für die standardisierte DNS-Bildzytometrie [1] werden durch den Zytopathologen interaktiv neben ca. 30 normalen Referenzzellen ca. 300 auffällige, zu messende Analysezellen ausgewählt. Eine andere Vorgehensweise besteht im automatischen Messen des DNS-Gehalts *aller* auf dem Objektträger vorhandenen Exemplare des Analysezelltyps. Dies ermöglicht zwar einen Einsatz als Screening-Verfahren und ist auch bei fehlendem Fachpersonal einsetzbar, wenn die Anzahl von Krebszellen in einem Präparat aber im Verhältnis zur Anzahl gesunder Zellen eher gering ist, kann es zu falsch-negativen Diagnosen kommen. Die DNS-Verteilung einer Krebszellpopulation wird dann im Histogramm von derjenigen der gesunden Population überlagert und somit nicht wahrnehmbar. Eine Tumorzell-positive Diagnose kann daher nur bei Detektion von unter Umständen selten vorkommenden Zellen mit abnormal hohem DNS-Gehalt gestellt werden. Für die Automatisierung wollen wir aber die Sensitivität der manuell durchgeführten DNS-Bildzytometrie erreichen. Dies soll durch eine automatische Auswahl auffällig veränderter Zellen erfolgen, anhand deren DNS-Verteilung letztlich entschieden wird, ob die Veränderung tatsächlich Krebs entspricht.

Existierende Ansätze für diagnostische Systeme arbeiten basierend auf morphologischer und textueller Analyse von meist morphologisch gefärbten Zellen [2, 3, 4]. Neben reinen Formmerkmalen finden häufig moment- oder histogrammbasierte Texturmerkmale Anwendung [5]. Spezielle weitere Merkmale für die Chromatinmusteranalyse finden sich in [5, 6].

3 Methoden

Unsere Basis-Merkmalmenge besteht aus morphologischen Merkmalen wie Fläche, Umfang, Formfaktor, sowie aus Fourier-Deskriptor-basierten Merkmalen. Weiterhin verwenden wir affin invariante momentbasierte Merkmale [7], sowie zusätzlich unabhängige momentbasierte Merkmale [8]. Diese sind berechnet für die Kernmaske als Erweiterung der morphologischen Merkmale, sowie für Extinction- [5] und Flat-Texture-Bild [5] als Texturmerkmale. Extinction- und Flat-Texture-Bild basieren beide auf dem Grünkanal des Originalbildes. Hinzu kommen histogrammbasierte Merkmale über das topologische Gradientenbild [5] und Merkmale wie Klumpigkeit, Homogenität, Verdichtung des Chromatinmusters zum Kernrand nach [6]. Unsere Merkmalsmenge umfasst derzeit insgesamt 203 Merkmale zur Beschreibung von Zellkernmorphologie und -textur.

Für die Ermittlung geeigneter Merkmalskombinationen (ohne alle möglichen Kombinationen zu testen) verwenden wir als parameterloses Suchverfahren Sequential Forward Floating Search (SFFS) [9]. Die Bewertung verschiedener Merkmalskombinationen erfolgt dabei durch die Bhattacharyya-Distanz [10], das Scatter-Matrix-Kriterium [11] sowie Mutual-Information [12] als Gütefunktionen.

Anforderungen an den Klassifikator sind die Nachvollziehbarkeit des Klassifikationsalgorithmus und der Fehlklassifikationen durch den medizinischen Partner, wie auch ein Konfidenzmass für die erfolgte Klassenzuordnung. Dieses ermöglicht darüberhinaus eine Sortierung der Zellen nach Auffälligkeit. Ohne eine

Tabelle 1. Ergebnis der Merkmalsauswahl. Aufgelistet sind pro Merkmalsgruppe die Klassifikationsraten (A;R;G) von (A)nalyse- und (R)eferenzzellen, sowie gemittelter (G)esamtrate in Prozent, das Gütekriterium ((M)utual-Information, (S)catter-Matrix-Kriterium, (B)hattacharyya-Distanz), die Anzahl der Merkmale, sowie Anzahl nächster Nachbarn des kNN für die beste Gesamtrate der Trainingsmenge. Die beiden gefundenen Merkmalskombinationen für Chromatin+Momente und Gesamtmerkmale sind identisch.

Merkmalsgruppe	Klassifikationsrate (A;R;G)	Güte-kriterium	Anzahl Merkmale	Anzahl Nachbarn des kNN
Morphologie	75, 5; 92, 3; 85, 2	B	14	3
Grünkanal-Chromatin	92, 5; 95, 2; 94, 1	B	14	1
Extinction-Chromatin	90, 2; 96, 5; 93, 8	B	19	3
Chromatin+Momente	90, 7; 98, 3; 95, 1	M	2	4
Gesamtmerkmale	90, 7; 98, 3; 95, 1	M	2	4

sinnvolle Annahme über ein parametrisches Verteilungsmodell treffen zu können, verwenden wir deshalb kNN und Fuzzy-kNN (F-kNN) zur Unterscheidung von Analyse- und Referenzzellen. Der F-kNN [13] wurde einmal mit der vom Zytopathologen klassifizierten $\{0, 1\}$ -Klassenzugehörigkeit der Trainingsdaten trainiert (F-kNN-a) und zum anderen mit einer zu den Klassenmittelpunkten abstandsgewichteten Klassenzugehörigkeit (F-kNN-b). Letzterer berücksichtigt insbesondere im Übergangsbereich zwischen Referenz- und Analysezellen, wie repräsentativ eine Zelle für eine Klasse ist. Als kNN trainierten wir eine Variante, die solange sucht, bis k Nachbarn der gleichen Klasse gefunden sind.

4 Experimente und Ergebnisse

Unsere Datenbasis besteht aus Feulgen-gefärbten, segmentierten Epithelzellkernen der Mundschleimhaut. Von einem Zytopathologen wurden 950 Referenzzellen aus 10 krebszellnegativen und 748 Analysezellen aus 5 krebszellpositiven Abstrich-Präparaten klassifiziert. Davon wurden 1300 Zellen als Trainingsmenge und 200 Referenz- sowie 198 Analysezellen als Validierungsmenge verwendet. Die Zellbilder wurden mit einem 63-fach Öl-Immersionsobjektiv und einer 3-Chip CCD-Kamera aufgenommen mit einer resultierenden Auflösung von $\approx 0.1\mu\text{m}$ Pixelkantenlänge.

Die Merkmale wurden auf den Bereich $[0, 1]$ normalisiert und zu fünf verschiedenen Merkmalsgruppen zusammengefasst: Morphologie, Grünkanal-Chromatin, Extinction-Chromatin, Chromatin+Momente (Kombination beider Chromatin-Gruppen inkl. momentbasierter Merkmale auf Extinction- und Flat-Texture-Bild) und alle Merkmale zusammengefasst in Gesamtmerkmale. Für jede dieser Merkmalsgruppen wurden für alle drei Gütekriterien geeignete Merkmalskombinationen berechnet und durch Leave-one-out Cross-validation auf der Trainingsmenge mittels kNN-Klassifikator für k von 1, ..., 10 bewertet (Tab. 1). Mit den besten Merkmalskombinationen pro Merkmalsgruppe wurden durch Klassifikation mit kNN und Fuzzy-kNN die Gesamt- und Einzelklassifikationsraten für

Tabelle 2. Validierung der Merkmalskombinationen und Klassifikatoren aus Tabelle 1 an der Validierungsmenge. Aufgelistet sind pro Merkmalsgruppe die Klassifikationsraten (A;R;G) von (A)nalyse- und (R)eferenzzellen, sowie die gemittelten (G)esamtraten der verschiedenen Klassifikatoren kNN, F-kNN-a, sowie F-kNN-b

Merkmalsgruppe	kNN (A;R;G)	F-kNN-a (A;R;G)	F-kNN-b (A;R;G)
Morphologie	75, 3; 92, 5; 85, 4	77, 7; 88, 5; 83, 2	57, 6; 98, 5; 78, 1
Grünkanal-Chromatin	91, 9; 97, 5; 94, 7	91, 9; 97, 5; 94, 7	80, 3; 93, 0; 86, 7
Extinction-Chromatin	93, 9; 95, 5; 94, 7	91, 9; 94, 5; 93, 2	73, 7; 93, 0; 83, 4
Chromatin+Momente/ Gesamtmerkmale	92, 4; 98, 5; 95, 5	93, 9; 97, 5; 95, 7	65, 7; 85, 5; 75, 6

die Validierungsmenge berechnet (Tab. 2). Die beiden Merkmale, die in Kombination die beste Trennraten erzielten, sind das Moment 0-ter Ordnung berechnet im Extinction-Bild (IMTOTE in [5]) als eine Schätzung der optischen Dichte, sowie der Median des Histogramms des topologischen Gradientenbildes (RG in [5]) des Grünkanals als ein Maß für die Inhomogenität der Chromatinverteilung.

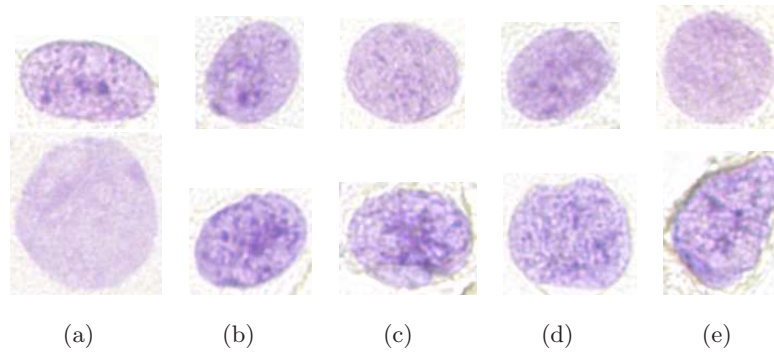
5 Diskussion

Auffällig ist die durchgängig unterschiedliche Klassifikationsleistung zwischen beiden Zellklassen. Ein wesentlicher Grund liegt in der unterschiedlichen Anzahl von Trainingsdaten beider Klassen, so dass die Klasse der Analysezellen zukünftig um weitere Musterzellen erweitert, oder ein anderes Klassifikationsverfahren angewendet werden muss. Das vergleichsweise schwache Abschneiden des F-kNN-b zeigt, dass die Voraussetzung gleicher Varianz zwischen beiden Klassen nicht erfüllt ist. Eine Analyse der Klassifikationsergebnisse ergab, dass für 7 der 12 falsch klassifizierten Analysezellen der DNS-Gehalt im Bereich des c-Wertes von Referenzzellen (zwischen 1.8c und 2.21c) lag. Relevant für die DNS-Bildzytometrie ist die optische Dichte der Referenzzellen und damit ihr c-Wert, nicht jedoch eine mögliche Chromatinmuster-Aberration. Diese Fehlklassifikationen haben somit nur einen geringfügigen Einfluss auf das diagnostisch relevante DNS-Histogramm. Unter den Fehlklassifikationen befanden sich darüberhinaus meist ausschliesslich Zellen der Gegenklasse unter den nächsten Nachbarn (Abb. 1). Ein Einsatz des Verfahrens in der Routine, d.h. die Klassifikation von segmentierten Objekten auf verschiedenen Objektträgern, sowie eine Untersuchung des Einflusses von Färbevariabilitäten, können nun getestet werden. Die gefundene Merkmalskombination korreliert mit dem Vorgehen der Zytologen und läßt damit eine Nachvollziehbarkeit der Entscheidung des Klassifikators zu. Zukünftig ist zu untersuchen, ob eine Feulgenfarbspektrum angepasste Filterung zu einer weiteren Verbesserung der Klassifikationsraten führt.

Danksagung

Das Projekt wird vom Viktor-und-Mirka-Pollak-Fonds unterstützt.

Abb. 1. Falschklassifikationen aus F-kNN-a: Spalte a) enthält zwei klassifizierte Zellen der Validierungsmenge. In Zeile 1 ist eine fälschlich als Referenzzelle klassifizierte Analysezelle, in Zeile 2 eine als Analysezelle klassifizierte Referenzzelle dargestellt. die Spalten b) bis e) enthalten die 4 nächsten Nachbarn der Gegenklasse



Literaturverzeichnis

1. Böcking A, et al. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1995;8(1):67–74.
2. Wittenberg T, Neubauer K, Küblbeck C, et al. Automatische Tumorerkennung bei unterschiedlichen Organen mittels Berechnung und Klassifikation von Texturmerkmalen. *Procs BVM* 2001; 377–381.
3. Fischer B, Palm C, Lehmann TM, et al. Selektion von Farbtexturmerkmalen zur Tumorklassifikation dermatoskopischer Fotografien. *Procs BVM* 2002; 338–341.
4. Zhou ZH, Jiang Y, Yang YB, et al. Lung cancer cell identification based on artificial neural network ensembles. *Artif Intell Med* 2002;24(1):25–36.
5. Rodenacker K, Bengtsson E. A feature set for cytometry on digitized microscopic images. *Anal Cell Pathol* 2003;25(1):1–36.
6. Young IT, Verbeek PW, Mayall BH. Characterization of chromatin distribution in cell nuclei. *Cytometry* 1986;7(5):467–474.
7. Reiss TH. *Recognizing Planar Objects Using Invariant Image Features*. Springer; 1991.
8. Suk T, Flusser J. Graph Method for Generating Affine Moment Invariants. In: *Procs ICPR*. vol. 2; 2004. 192–195.
9. Pudil P, Novovičová J, Kittler J. Floating search methods in feature selection. *Pattern Recognition Letters* 1994;15(11):1119–1125.
10. Fukunaga K. *Statistical Pattern Recognition*. Academic Press; 1990.
11. Duda RO, et al. *Pattern Classification*. John Wiley & Sons; 2001.
12. Pluim JPW, Maintz JBA, Viergever MA. Mutual information based registration of medical images: a survey. *IEEE Trans Med Imaging* 2003;22(8):986–1004.
13. Keller JM, Gray MR, Givens JA. A Fuzzy K-Nearest Neighbor Algorithm. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 1985;SMC-15(4):580–585.