

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500558

研究課題名(和文) 自動化細胞単離装置凍結乾燥試薬を応用したがん迅速診断支援装置の開発

研究課題名(英文) Development of the diagnostic equipment for solid carcinoma using cell cycle.

研究代表者

武田 朴 (Takeda, Sunao)

早稲田大学・理工学術院・その他

研究者番号：40583993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん診断を目的として、固形がんの組織を専用試薬中で攪拌し細胞を単離し、細胞懸濁液化し、フローサイトメータを用いてDNA量ヒストグラムを数分で得た。消化器がんとくに大腸がんにおいて得られたヒストグラムを、G0/G1期のピークを200高さを1に規格化して各細胞周期における細胞数比率を特徴量とし、次にヒストグラムにFFTを施し、パワースペクトルを得てその曲線下面積、振動数、最大傾斜を特徴量とした。特徴量と病理診断結果を対照し、スキャッタグラム、樹形図、サポートベクターマシンなどを用いてがん検出論理を構築した。構築したアルゴリズムは感度特異度とも90%以上を示した。

研究成果の概要(英文)：Tissue of the solid carcinoma were made in to cell suspension by stirring in the solution of PI and a surfactant. Then DNA histogram were measured using a flow site meter. The process are done in several minutes. The histograms are standardized peak address into 200 and number of cells at 200 in address into 1. The cell count ratio of each cell cycle were calculated. Power spectrum of the histogram was calculated by FFT. Area under the curve, number of vibrations and maximum slant of the power spectrum were calculated from the power spectrum. These feature are compared with the pathological diagnosis using scattergram, tree-diagram, and support vector machine. These analysis shows over 90% on sensitivity and specificity.

研究分野：医用工学

キーワード：がん診断 細胞周期 DNA量 FFT

1. 研究開始当初の背景

がんは日本における死因の30%を占め、その早期発見と有効な治療法の研究は国家的な課題である。癌の治療は早期発見であれば根治手術が行われる。根治手術を成功させるには早期発見が正確かつ迅速に行われる必要がある。がんの早期発見には、消化管の場合、内視鏡による画像診断と生検標本の病理診断が不可欠である。これらの検査は熟練した病理医の技術が必要である。優れた診断支援装置があれば、診断の確度向上と病理医の負担軽減がはかれる。今までに、造血器腫瘍についてはフローサイトメータを用いた ploidy 解析が、細胞単離が容易なうえに、再現性のよいデータが得られるので臨床に應用されている。固形がんに関しては、用手法による細胞単離と試薬調製に30~40分要するうえに、pseud aneuploidy(pseud)といわれる、成因不明のピークがG0/G1期付近に生じるなど、再現性が乏しく、臨床診断への適応は困難であった。現在、凍結乾燥試薬と自動細胞単離装置(単離装置)を用いることにより、材料投入から7~8分で解析結果が得られるようになり、脳腫瘍に対する手術断端の診断を迅速に行い、後遺症を最小限にして、最大の治療効果を狙う際の断端診断の迅速化を目指す研究が進んでいる。脳腫瘍の研究においては、pseud が観察されるケースは少なく、G0/G1よりもDNA量の多い細胞数の、G0/G1期の細胞数に対する比率を見ることがかなりの診断成績を上げられるとの見通しを得ている。

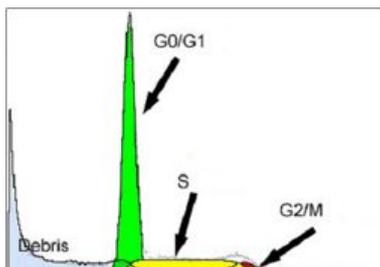


図1 細胞周期

https://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple_8-3.html から引用

図1に正常な組織のDNA量の分布を示す。正常な組織のG0/G1期細胞内のDNA量をアドレス200に設定すると、G2/M期の細胞は正常の二倍すなわちアドレス400付近に現れ、200から400の間にS期細胞が分布するが、正常な細胞であれば、先行研究の成果によりG2/M期とS期の細胞数はG0/G1の細胞数の1から2%程度以下と考えられる。

がん化した細胞にはDNA量が増加したものとDNA量は変化せず単純に増殖する細胞の数が増加するものが見られるが、いずれも正常細胞のG0/G1期以外の場所にピークが見られる。したがって、固形がんであっても細胞を迅速に単離し、DNAヒストグラムを得ることにより、迅速に診断することが可能ではな

いかと期待して研究に着手した。さらに、用手法による先行研究においてはpseudがなぜ生じるかについての議論が盛んにされていた。われわれは、pseudの発生する原因よりもG0/G1期近傍の(誤り情報が含まれると思われる)領域とそれ以外の領域を分離して考えることにより診断精度の向上が図れるのではないかあるいは、がん組織のploidy patternが広い領域に広がる傾向に着目して、DNAヒストグラムの空間周波数分析を行い、DNA量のばらつきを評価することによりがん診断が可能になるのではないかという二つの期待を持って研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は迅速な診断結果が数分で得られる特長を生かして、がんの病理診断支援特に内視鏡検査において高い有効性と迅速性が期待できる病理診断の支援を行うシステムの開発を目標とする。

3. 研究の方法

3.1 対象

内視鏡による生検標本の解析装置の開発を目標としているが、内視鏡による生検標本はヒトの臓器の切片であり、研究目的で採取するには、十分な診断能力を持つことが期待される状況で、最終的な性能の確認にいたるまでは行うべきではないと考え、摘出し必要な標本を作成した後廃棄される消化器がんの開腹手術材料(手術材料)を用い、大腸がんと正常組織の識別のアルゴリズムの確立を図り、必要最小量の標本量を定めるなど、検査に際して患者に与える侵襲を最小限にする準備も重ねた後に内視鏡による生検標本による研究を開始することとした。

3.2 細胞単離手順と蛍光強度分布の測定

サイトメトリー学会のガイドラインに従って開発したTriton X-100、propidium iodide (PI) (DNA量に比例した蛍光を発する色素)、RNaseAなどを含む凍結乾燥試薬(日本光電製)を2.5mlのアイソトナック(日本光電製buffer.)を用いて試験管内で溶解し、約2mm³大の組織を試験管に投入した。

自動細胞単離装置(日本光電製)を用いて試験管に投入された組織を約6分間ピペティングし、懸濁液化した[8]。

懸濁液は40μmナイロンメッシュで濾過し、測定標本とした。単離結果の確認は取得細胞数で行った。

濾過液はフローサイトメータ(FACS Calibur BD社、NJ. U.S.A.)にて測定し、蛍光強度分布のデータを取得した。

3.3 病理標本の作製

採取したサンプルは二分しひとつは冷凍後薄切しHE、LCA、vimentin、サイトケラチンなどで染色した、HE染色した標本を用いて病

理診断を行うとともに、顕微鏡写真を撮影し、ヒストグラムとの比較検討を行った。

3.4 解析法の研究

取得した蛍光強度分布を観察しパターン分類を行い病理診断結果と比較した(パターン法)。CSV ファイルに変換し、科学計算用言語 MATLAB (Mathworks) を用いてえられた蛍光強度分布を解析するプログラムを作成し、ヒストグラムの規格化、領域ごとの細胞数計数を行い領域ごとの細胞数比率を用いたアルゴリズムを開発(領域法)した。規格化ヒストグラムに FFT の演算と特徴抽出を行い臨床診断結果と比較して診断アルゴリズムの検討を行った。(FFT 法) 得られた特徴は統計ソフト SPPlus (数理システム) を用いて統計解析を行った。また、ソフトウェアはウィンドウズ7搭載のパーソナルコンピュータに組み込んで使用した。

3.5 細胞単離装置および試薬の検討

細胞単離法について、食用豚の新鮮大腸を屠殺直後(水洗前に)購入し現場で持参した生理的食塩水を用いて洗浄後研究室において細胞単離の検討を行った。

4. 研究成果

4.1 成果の概要

がん研究会有明病院に於けるデータ収集により約 600 件、300 例程度の消化器癌のヒストグラムを測定した。採取した組織を 2 分して片方を用いて薄切標本作製し、HE, LCA, ビメンチン、サイトケラチン、無染色標本作製した。残りを単離染色した。対象とした組織は主に大腸、胃、食道、肝である。

詳細は後述するが結果をまとめると次のとおりであった。
ヒストグラム法の結果：ヒストグラムと組織の病理診断結果を対照しヒストグラムをパターン分類し、従来の diploidy, aneuploidy パターへ分類に atypical ploidy を加えさらにこれを 4 つのパターンに分類し、病理診断と比較した。atypical ploidy を分類したうちの spread type はすべてがんであり、他にはがんと正常が混在し識別困難であった。
領域法と FFT 法の結果：次にヒストグラム診断の定量化を目指して、ヒストグラムを規格化しその領域ごとの細胞数比率と空間周波数分析による特徴抽出を行い、特徴と病理診断結果を比較して診断アルゴリズムを開発した。詳細は後述するが、領域法においては s 期の細胞数比率が最も高い感度、特異度を示し、感度 90%以上、特異度 80%以上を示した。さらにパワースペクトルの最大傾斜が領域法と FFT から得られた特徴の中で最も高い感度特異度を示し感度特異度とも 90%以上を示した。

単理法および試薬：細胞単離および染色試薬について文献検討および実験を行い開発し

た装置と試薬の性能を確認した。試薬についてはさらに改良を進める必要がある。

4.2 スクリーニング

生体から取得した信号から、雑音除去を行う場合、最初に明らかな雑音を除去した後、除去が困難な雑音を取り除くという手順で行うのが一般的である。がん診断においても、

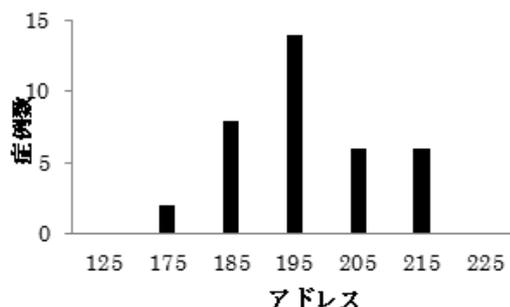


図2 ピークアドレスの分布

がん細胞のヒストグラムは正常細胞のヒストグラムに対する雑音とみなし、明らかにがんの特徴を示すヒストグラムはあらかじめがんと判定することとした。そこで、正常組織 39 例について、G0/G1 期のピークアドレスを測定したところ、平均値 192、標準偏差 10.8 が得られた。図 2 にその分布を示す。平均値と標準偏差から、最大ピークアドレスが 230 以上を示す確率が 0.01%以下になると予測できたので、アドレス 230 以上に最大ピークをもつ組織は、あらかじめがんと判定した。同様に最大ピークアドレスが 170 以下もがんと判定した。本研究で解析した 46 例中、G0/G1 期のピークがアドレス 230 以上に存在する組織は 17 例であり、あらかじめがんと判定したが、病理組織診断と一致し、すべてがんであった。正常組織の G0/G1 期のピークの平均値と標準偏差から予測すると、わずかな確率で正常組織が含まれることになるので本スクリーニング法を採用した。また、本研究においては、正常組織の混入は 1 例もなかった。

表1 スクリーニングの効果

パラメータ	Slope		S 期		
	なし	あり	なし	あり	
スクリーニング					
Statistical	感度	96	97	91	97
	特異度	100	100	77	82

スクリーニングの効果の例を表 2 に示す。事前にピークアドレスの大きさをスクリーニングを行うと感度と特異度が向上することがわかった。

4.2 ヒストグラムのパターン分類

典型的な Aneuploidy と Diploidy を示さないヒストグラムを新たに Atypical Ploidy と新たな分類を設けて分類し、さらにこれを図 2 表 2 に示すように Spread、Debris、

Shoulder、Wide の4つに目視で分類して診断結果と対比した。この結果と病理診断の結果を比較した結果を表3に示す。この結果は Aneuploidy と Spread を示す組織はがん、Diploidy を示す組織は正常、それ以外のパターンを示す組織はがんとノーマルが混在するという結果を得た。新たなパターン分類を定量化すると診断精度の向上が期待できるという結果が得られた。

表2 ヒストグラムの分類

1	Diploidy	
2	Aneuploidy	
3	Atypical ploidy	
3-1	sub	Wide type
3-2		Shoulder type
3-3		High debris type
3-4		Spread type

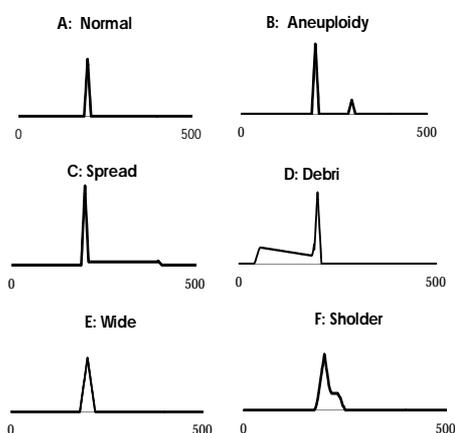


図3 ヒストグラムのパターン分類結果

表3 表2に従ったヒストグラムの分類結果
Table 3 Result of classified according to table 2.

Category	Normal	Cancer
Total	26	26
Diploidy	11	0
Aneuploidy	0	13
Atypical ploidy	15	13
Sub	Spread	(0) (4)
	Debris	(1) (2)
	Shoulder	(7) (4)
	Wide	(7) (3)

4.3 領域法による定量化診断法の検討結果

ヒストグラムパターンの定量的診断を行うには標本毎に取得細胞数が異なることと、ピーク位置の変化が光量の絶対値に対して20%程度ずれると言われているのでこの補正を目的にヒストグラムの規格化を行った。

規格化を行った後、図4に示すようにDNA量を示すアドレスを1から150までをDebris領域、151から270までをG0/G1、271から350までをS期、351から450までをG2/M期、450以上をOverG2/Mと定めた。その間の細胞比率を積分した値を特徴量と定め、病理診断

結果と比較した。その結果、感度特異度とも80%程度がえられた。この分類はpseudoの影響を避けるために、G0/G1期の上限が広がっている。また、細胞数の基準を蛍光強度最強点における細胞数とした。

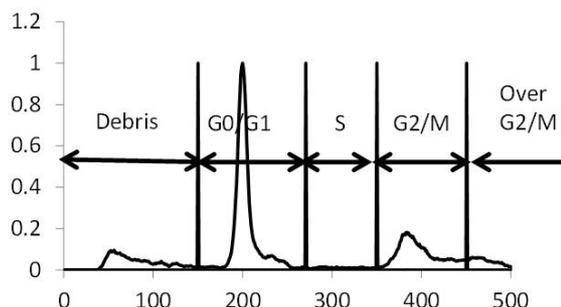
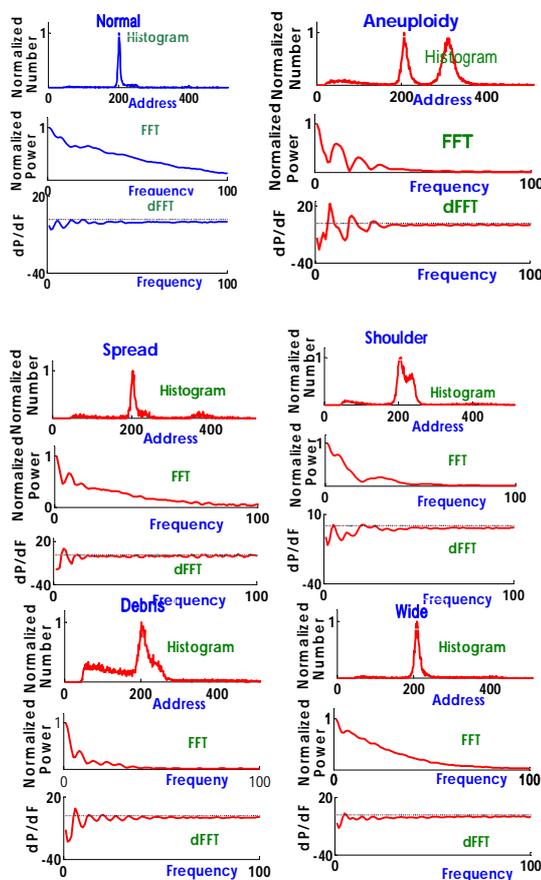


図4 領域の定義



Diploidy 上左 Aneuploidy 上
Spread 中左、Shoulder 中右
Debris 下左 Wide 下右

図5 ヒストグラムパターンとそのFFTパターンと微分FFTパターン

4.4 FFT法

規格化したヒストグラムを表1に従って分類、FFTを用いてパワースペクトルパターンを得た結果を図5に示す。Normalと比較するとパワースペクトルパターンと微分パワースペクトルパターンはAneuploidy、他の異常ヒストグラムと異なる形状を示している特にパワースペクトルの曲線下面積と振動

数、微分パワースペクトルの最小値が異なることがわかる。FFTとdFFTから得られる特徴を曲線下面積(AUC)、振動数(OSC)、最大傾斜(Slope)としその定義を図6に示す。AUCとSlopeはDNA量のばらつきが大きいとAUCが小さくなり、Slopeの絶対値が大きくなる。ピークが複数あるとdFFTは振動波形を示す。

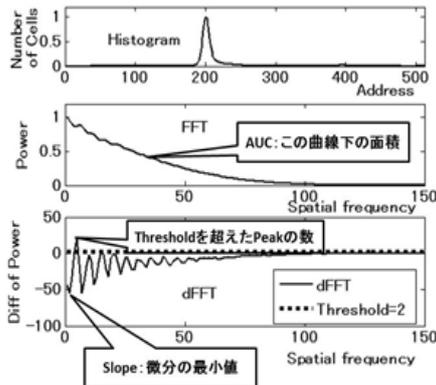


図6 FFTの特徴の定義

4.5 診断論理の構築(1)スキャッタグラム

得られた特徴量すなわち領域法でえられたDebris、G0/G1、S、G2/M、OverG2/Mにおける細胞比率と、AUC、OSC、Slopeについてがんと正常を比較してそれぞれのパラメータについて感度特異度を求めROC曲線を描き判別能力の高いパラメータを選択しS期細胞比率と、Slopeの散布図を作成し判別線を引き感度特異度を計算した。図7にROC曲線の例を示す。

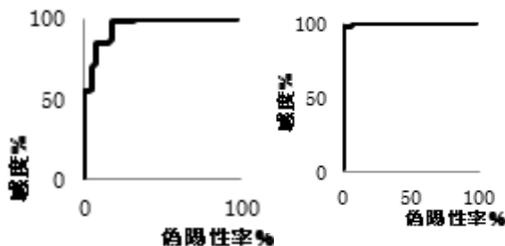
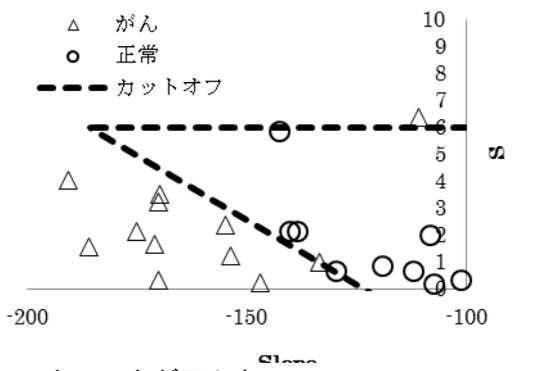
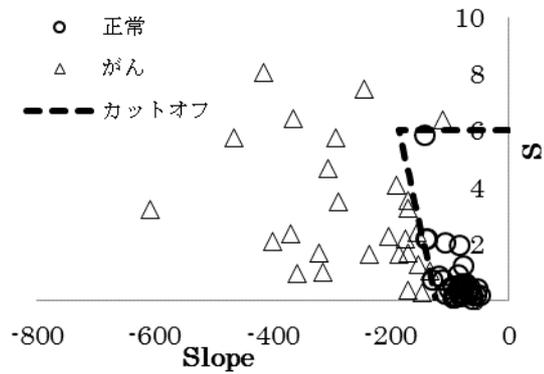


図7 ROC曲線の例

表4 散布図による感度、特異度

項目	感度	特異度
Slope・OSC	98	92
Slope・S	100	100
Slope・G2/M	98	100

複数の特徴量を用いて診断能力の向上を測る目的でスキャッタグラムを用いて目視で判別線を引き調べて。得られた感度特異度の代表例として、SlopeとOSC、SlopeとS、



スキャッタグラム上
拡大スキャッタグラム下
図8 SlopeとSのスキャッタ

SlopeとG2/Mについて求めた結果を表4に示す。また、作成したスキャッタグラムのカットオフラインを図8に示す。

4.6 診断論理の構築(2)

診断論理を機械的学習法で構築するとどのような結果が得られるか検討をPlusに組み込まれたサポートベクターマシン(SVM)を用いて行った。サポートベクターマシンへの入力データは領域法とFFT法で得たすべての特徴量として、モデルを構築し、そのバリデーションをleave one out 交差検証法を用いて行った。

表5 SVMを応用した診断

病理	SVMによる予測	
	がん	正常
がん	26	3
正常	2	24

得られた結果から感度 88% 特異度 95%であった。

4.7 まとめ

DNA量分布を測定してその特徴量を用いてがんを診断する技術の可能性を見出した。可能性は大きき医が、がんを見落とししたときの損失とがんの多様性を考えたとき、さらにデータを蓄積しアルゴリズムの改善を図っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1) 日向奈恵 神田浩明 塩山高広、鈴木あかね 武田朴 石川雄一、山口俊晴、加藤洋 2014年 FFTと領域法を組み合わせたDNA ploidy解析による癌診断法の研究 生体医工学 Vol52No.3 pp136-144 査読あり

2) 日向奈恵 神田浩明 塩山高広、鈴木あかね 武田朴 石川雄一、山口俊晴、加藤洋 DNA Ploidy解析にFFTを応用した新しい癌診断法の研究 2013年 生体医工学 vol.51.N02 pp103-111 査読あり

[学会発表](計7件)

1) 日向奈恵 神田浩明 塩山高広 鈴木あかね 武田朴 石川雄一 山口俊晴 加藤洋 「DNAヒストグラム解析を応用した胃癌診断法の研究」SI2015 2015年12月6日 名古屋 名古屋国際会議場

2) 石川和花、塚原慧、日向奈恵、河西理恵、永岡隆、武田朴 「大腸における組織内炎症細胞比率の研究 正常組織とがん組織の比較」 日本医療機器学会大会. 2014年6月14日. 新潟市 新潟・朱鷺メッセ

3) 塚原慧,高巢寛徳,石川和花,日向奈恵,武田朴,加藤洋. 「規格化ヒストグラムを用いたがん診断法の研究 - フローサイトメータ応用 - 」 2013年12月18日 神戸市 神戸国際会議場

4) 日向奈恵, 神田浩明, 塩山高広, 鈴木あかね,武田朴,石川雄一, 山口俊晴,加藤洋 「新しいがん診断法の研究 新しいがん診断法の研究 規格化ヒストグラムとFFT法の組み合わせによる-DNA ploidy解析-」生体医工学シンポジウム2013 2013年9月20日 福岡県、九州大学伊都キャンパス

5) A.Suzuki, T.Shioyama, H.Kudo, Y.Fukushima, K.Naemura, ~~Hinata,~~ S.Yamamori, S.Takeda, T.Yamaguchi, Y.Ishikawa, Y.Kato "A New Automatic Cell Isolation System for Flow Cytometry: Cell Isolation Unit and Staining Reagent Kit", IEEE EMBC '12 2012,08,29 San Diego Hilton hotel, San Diego USA 査読あり

6) S. Takeda, N. Hinata, H. Kanda, A. Suzuki, T. Shioyama, Y. Ishikawa, T. Ymaguchi, Y. Kato "Flow cytometry as a diagnostic method for colorectal cancer" IEEE EMBC '12 2012,08,29 San Diego Hilton Hotel, San Diego USA 査読あり

7) 神経膠腫の術中迅速解析のためのフローサイトメトリーによる腫瘍悪性度判定の検討 塩山高広、丸山隆史、村垣善浩、伊関洋、小森隆司、新田雅之、齋藤太一、田中雅彦、山森伸二、武田朴、Mikhail Chernov,岡田芳和 日本脳神経外科学会 2,011年10月18日 パシフィコ横浜 横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者 武田 朴 (Takeda Sunao) 研究者番号: 40583993 早稲田大学理工学術院総合研究所(理工学研究所) 招聘研究員

(2) 研究分担者 日向 奈恵(Hinata nae) 研究者番号: 3269290322 東京工科大学医療保健学部臨床工学科専任講師 南 順子(Minami Junko) 研究者番号: 30587655 東京工科大学医療保健学部臨床工学科専任講師

志水 美文(Shimizu Mifumi) 研究者番号: 30396759 東京工科大学医療保健学部臨床工学科専任講師

加藤 洋(Kato Yo) 研究者番号: 20010473 癌研究会付属がん研究所非常勤研究員