

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21336

研究課題名(和文) 移植腎病理診断におけるプレクリニカルな診断支援システムの開発

研究課題名(英文) Development of a preclinical diagnosis support system in transplanted kidney pathology diagnosis

研究代表者

石川 雅浩 (Ishikawa, Masahiro)

埼玉医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号：70540417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、移植腎病理組織画像中の構造認識と機械学習を用いた機能推定法の開発を行っている。本事業では、Whole Slide Imagingを対象に移植腎病理標本中の皮質・髄質領域の判別と糸球体の抽出と周辺線維量の定量化法を開発した。また、スペクトル画像を用いた構造認識法についても検討し、従来のRGB値を用いた手法よりも高精度に組織構造認識が可能なことを示した。最後に、臨床データ等を用いて移植腎機能推定を行い、最大で85%の精度で腎機能推定の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a function estimation method using structure recognition in transplanted renal pathology tissue images and machine learning. By targeting whole slide images, we determined the cortex and medullary regions in a transplanted renal pathology specimen, extracted the glomerulus, and developed a quantification method for the number of peripheral fibers. We also examined a structure recognition method using spectral images, which proved that it could recognize the organization structure more accurately than conventional methods using the RGB value. Finally, we estimated the transplant renal functions with clinical data, which showed the possibility that this method can estimate the functions at a maximum accuracy of 85%.

研究分野：画像処理

キーワード：病理画像処理 定量化 whole slide imaging ハイパースペクトル画像 マルチスペクトル 色補正
構造認識 Computer Aided Diagnosis

1. 研究開始当初の背景

移植腎の機能評価には、血液検査・尿検査、画像診断、病理診断などが併用される。血液検査・尿検査や画像診断は簡便に実施可能だが、拒絶反応を詳細に把握することは不可能である。これに対して、病理診断は組織を直接観察するため、他の検査に比べてより正確な診断が可能と考えられている。移植腎の組織障害度分類として、バンフ分類が広く用いられている。バンフ分類は、現在も改良され発展し続けている。しかし、バンフ分類の診断基準の多くは専門医が組織を観察して経験的に細胞浸潤や萎縮尿細管を評価するため定量性が低い。そのため、検査時の組織の状態を正確に把握し、対処療法的に治療を選択するに留まっている。移植腎の更なる生着率向上を目指して、組織障害を早い段階で把握する方法の開発が望まれている。これに対して、Whole Slide Imaging (WSI) と呼ばれるコンピュータ上で自由に倍率を変更しながら標本全体を観察可能なデジタル画像が普及しつつある。WSI の普及に伴って、がんの自動診断や定量化に関する研究が行われている。

2. 研究の目的

糖尿病等を原疾患とする末期腎不全患者の増加は世界的問題となっている。これに対する根治的治療法は腎臓移植しか存在していない。現在は、移植腎生着率向上のために定期的に病理診断を行って組織障害が検査されている。しかし、病理医が経験的に診断するため定量化されておらず、定期生検によって得られる経時的変化を診断に用いることは困難である。そのため、移植腎の組織障害を定量化し、経時的変化を追うことで拒絶反応を推定して治療する、プレクリニカルな診断の実現が切望されている。本研究の目的は、移植腎病理組織画像中の構造認識と機械学習を用いた機能推定法の開発である。

加えて、病理画像中の組織構造をより詳細に評価するため Hyper Spectral Imaging (HSI) を用いた組織構造認識法についての検討も行う。HSI は、光学顕微鏡で組織標本を撮影する際に、分光しながら撮影することで RGB 画像よりもより詳細な透過光情報を取得可能である。特に、本研究では HSI 画像を用いて糸球体基底膜が抽出可能かについて中心に検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 低倍率 WSI 中の皮質領域の自動抽出

WSI 画像は非常に大きな画像である。そこで、本研究では WSI 画像を 2000×2000 画素の小領域に分割し、小領域ごとに皮質・髓質の判定を行うこととした。

(2) 高倍率皮質画像中の自動構造認識

EVG 染色画像は、線維と細胞質と細胞核を

別々の色で染色するため色情報を用いて簡便な構造分類が可能である。この情報を元に領域ごとに構造認識する。本研究で対象とする糸球体、線維、尿細管である。

(3) 組織障害度定量化・イメージングの実現

認識した組織構造から、組織状態の定量化法について検討を行う。また、組織障害が進行すると尿細管が萎縮することを知られており、萎縮尿細管の定量化についても検討を行う。

(4) 組織障害度進行の推定

組織障害の進行度推定については、画像特徴や臨床検査の結果などの臨床情報を用いて機械学習によって予後推定が可能かについての検討を行う。

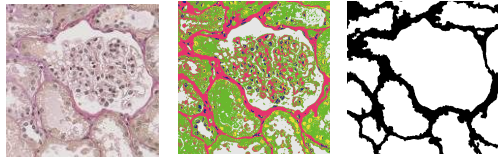
(5) 開発手法の有効性の検証と手法の改善

WSI から得られた抽出精度について検証し、高精度化についての検討を行う。また、WSI 画像は広範囲を撮影するため、低解像度画像になることが知られている。そこで、本研究では HSI 画像を用いて糸球体基底膜の構造認識が可能かについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) 低倍率 WSI 中の皮質領域の自動抽出

本検討では、小領域に分割した EVG 画像ごとにベイズ推定に基づく組織構造推定を行った。色分類クラスには、細胞質、細胞核、膠原線維、弾性線維、ガラス領域の 5 クラスを用いた。色分類結果から、膠原線維と弾性線維に分類された領域を線維領域として取り出し、残りの領域を尿細管や糸球体領域候補として抽出する。抽出の様子を図 1 に示す。次に、抽出した小領域ごとに形状特徴として、円形度、離心率、面積、円形形状数、円形形状数の比、複雑度、DM (Derivative-Matching) 特徴量、色特徴量として輝度平均、輝度標準偏差、コントラスト、外側コントラスト、病理学的特徴として、エッジ画素数、細胞核の数、細胞質の面積、細胞質のフラクタル次元等の特徴量を算出し、Random Forest を用いて皮質尿細管と髓質尿細管の分類を行った。分類精度は、Out of Bag error rate において 0.015 と非常に高い値を示したが、皮質中の線維化の進んだ尿細管において誤判定が見られた。そこで、小領域画像ごとに皮質尿細管と髓質尿細管の数を数え、多数決で小領域ごとに皮質髓質の判別を行った。この時、組織障害の強い領域において誤判別が見られた。そこで、周辺の小領域と多数決を行って、孤立して髓質領域と判別された場合は、皮質領域として補正することとした。これは組織構造的に髓質領域が孤立して存在することはあり得ないため、妥当な仮定と考えられる。実験に用いた原画像を図 2、正解画像を図 3、分類結果を図 4 に示す。



(a)原画像 (b)色分類画像(c)組織領域
図1 組織領域抽出

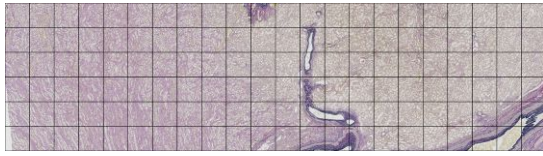


図2 小領域分割画像(原画像)



図3 皮質・髄質正解画像

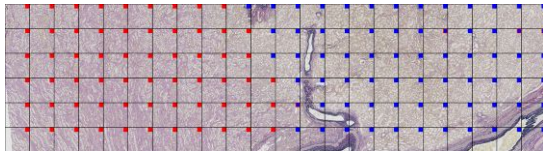


図4 皮質・髄質判別結果

(2)高倍率皮質画像中の自動構造認識

EVG 染色標本において、細胞核や細胞質等の基本的組織構造は色情報を用いて抽出可能である。そこで、本検討では組織障害と関係の深い糸球体の抽出を行った。尿細管は、細胞が円状に並んでおり、糸球体は基底膜を含んで尿細管よりも大きな構造をしているため領域が特定できれば特徴量を用いて判別可能と考えられる。しかし、臨床病理画像においては組織障害等の影響により糸球体の構造も大きく変化することが想定される。そこで、本検討では様々な特徴に基づいて糸球体を抽出することでより安定した糸球体の抽出を試みた。第一に、線維領域に基づいた候補領域を抽出する。(1)で示した様に、色情報を用いて線維領域を抽出する。糸球体の多くは線維に囲まれており、線維に囲まれた領域を糸球体領域として抽出する。この時糸球体を囲む線維は場合によって綺麗に周囲を囲っていないため、線維領域の接続処理を行う。線維領域の接続は、線維領域を細線化処理し、端点同士を一定の規則に基づいて接続する。本検討で想定する糸球体の線維の様子を図5に示す。図5は、糸球体周辺の線維を細線化したものだが、点Aと点Cの接続が途切れてしまっている。この時、近い端点同士を接続すると点Aと点Bが接続されてしまう。そこで、細線化画像を端点と分岐点ごとに分割していき、点Aからの枝の数を階層的に数えていく。枝ごとに階層を付けていくと図5のような結果が得られる。本検討では、

この階層数が5以上50以下の端点のみを接続することとした。

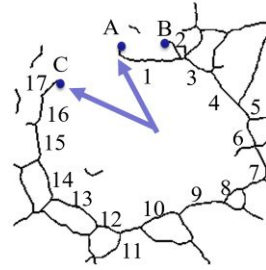


図5 端点接続の概略

第二に、ボーマン腔領域に着目した。糸球体は、ボーマン腔と呼ばれる空域を備えていることがある。ボーマン腔は月形をした空域であり、簡単な閾値処理で抽出可能である。本検討では、大津の閾値を用いて病理画像を2値化し、画像中の白領域を取り出す。次に、領域ごとに Solidity を算出する。Solidityとは、白色領域の面積に対する凸比率であり、ボーマン腔のように月形をしているほど値が大きくなる。抽出したボーマン腔ごとに2次元フィッティングにより楕円を抽出し、抽出した領域を糸球体候補領域とする。最後に、抽出候補領域ごとに特徴量を算出し Random Forest を用いて糸球体を抽出する。結果を表1に示す。手術標本4枚を対象に実験を行い、抽出感度90%、誤検出10%という結果が得られた。

表1 糸球体抽出精度

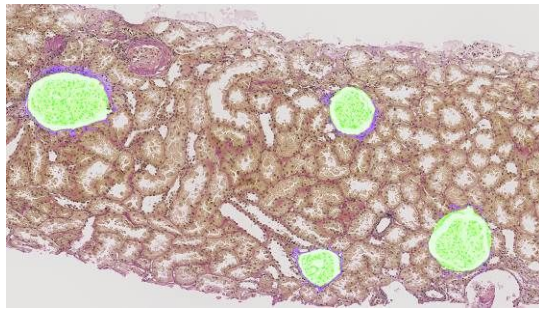
	No.1	No.2	No.3	No.4	合計
糸球体総数	22	27	32	22	103
誤検出	3	6	1	0	10
検出数	19	21	31	22	93
感度	0.86	0.77	0.97	1	0.90
誤検出率	0.14	0.22	0.03	0	0.10

(3)組織障害度定量化・イメージングの実現

組織障害の定量化法としては、本検討では抽出した糸球体の周辺の線維量・線維の厚さなどを算出し定量化を行うこととした。具体的には抽出した糸球体周囲の線維を算出し、その厚さや糸球体に対する線維量の算出を行った。実際に抽出した様子を図5に示す。図5(a)が原画像であり、図5(b)が糸球体と線維を抽出した結果である。図5(b)において、糸球体を緑色、線維領域を青色で示している。また、組織障害の進行度推定を想定して、画像情報以外で取得可能な臨床情報も合わせて使用できるよう収集を行った。



(a) 針生検原画像



(b) 系球体と周辺線維抽出結果

(4) 組織障害度進行の推定

組織障害度進行の推定として、臨床データと提案法を組み合わせ、CT, CI スコアが予測可能か検討を行った。CT, CI スコアとは、移植腎病理診断において一般的に用いられるバンフ分類のスコアであり、CT スコアは尿細管萎縮、CI スコアは間質線維化を病理医が評価したものである。実験には、34 名分の被験者データを使用し、CT スコアは 1 が 18 名、2 が 11 名、3 が 5 名である。CI スコアは 0 が 3 名、1 が 15 名、2 が 11 名、3 が 5 名である。推定法として、本検討では RandomForest を用いて交差検証により、CT スコアや CI スコアが推定可能かについて検討を行った。具体的には、臨床データ等から得られた 33 の特徴量をもとにフォワードステップワイズ法を用いて特徴選択を行い、推定に有効なデータを検索した。この時、各スコアにばらつきが生ずるため 2 以上を 1 としてデータ数を均等にして評価することとした。結果として、CT スコアの予想には退院時の収縮期血圧、免疫抑制剤のタイプ (CsAm, FK, MZR, AZP)、入院時の血圧が寄与することが分かった。クロスバリデーションによる推定精度は 85%であった。CI スコアの予想には退院時 BMI、退院時血圧、免疫抑制剤のタイプ (CsAm, FK, MZR, AZP3) が寄与することが分かった。クロスバリデーションによる推定精度は、76%であった。当初、線維化を表す CI スコアについて提案法の貢献が期待されたが、精度の点で寄与度が低くなってしまったものと考えられる。また、共通して免疫抑制剤のタイプが推定に役立つことが分かった。免疫抑制剤は移植腎の状況により選択されるものであり、その観点から推定に貢献したものと考えられる。

(5) 開発手法の有効性の検証と手法の改善

手法の改善として、Hyper Spectral Imaging (HSI) を用いた組織構造の認識について検討を行った。まず、組織構造の多彩な肝病理画像を対象に検討を行った。本検討では、まず組織分類に有効な波長を選択する。次に、選択した波長に対して、画素単位の Bag of features (BoF) を生成する。最後に、生成した画素単位 BoF を用いて機械学習の Random forest (RF) により分類を行い、分類結果を得て評価した。この時、スペクトル情報を用いた色補正を適用した方が良いかについても合わせて検討した。実験には、Biomex 社の Human Liver Cancer Tissue Microarray HE 染色標本を使用し、MSI の撮像にはエバ・ジャパン社製の NH-3 を用いた。MSI の画像サイズは 752 × 480 [pixel] である。波長範囲は 420 ~ 720 [nm]、5 [nm] 間隔の 61 バンドである。分類対象にした組織は、細胞核、類洞、リンパ球、線維、細胞質の 5 つの組織とする。使用画像は 3 枚とし、学習用 2 枚・テスト用 1 枚で 3-fold cross-validation により分類精度を算出する。BoF のコードブック数は 60 とした。色補正で用いる基準画像は、コントラスト値が高い画像とする。分類精度を表 2 に示す。また、従来法との比較として RGB 画像の輝度値を分類に使用した結果も示す。RGB 値と比較すると、全体正解率で選択波長では 4%、BoF を用いると BoF なしと比べて 2% 分類精度が向上した。また、色補正を加えることで更に 18% 向上した。特に線維に着目すると、RGB 値のみ、選択波長のみ、色補正なし BoF では 50% 未満の分類精度が、色補正を加えることで 87% の分類精度が得られることが確認された。

加えて、本検討となる腎病理画像の構造認識に提案法を応用した実験を行った。主な対象となる、細胞質、細胞核、線維に加えて系球体内の細胞核を対象として分類を行った。実験には Tissue Micro Array を用いて異なる組織から 4 か所の系球体画像を撮影し、分類を行った。結果を表 3 に示す。RGB 画像は平均精度 63% になり、HSI 画像に BoF と色補正を適用した結果は 81% となった。組織によっては RGB 画像の識別精度が高いように見えるが、これは多くの分類を細胞核や細胞質に割り振っているためである。特に本検討で対象とする基底膜に類似する線維は 90% の精度で分類できていることが確認できる。BoF を用いた手法は対象画素の周辺情報を含むため線維のような特徴的なテクスチャを持つ構造に対して特に有効と考えられる。

表2 分類精度

	RGB	選択 波長	BoF 色補正 なし	BoF 色補正 あり
細胞核	0.84	0.85	0.88	0.91
類洞	0.80	0.84	0.86	0.91
リンパ 球	0.40	0.40	0.30	0.46
線維	0.28	0.44	0.38	0.87
細胞質	0.54	0.45	0.56	0.68
全体	0.57	0.61	0.63	0.81

表3 腎病理標本における分類精度

	RGB	BoF 色補正あり
細胞質	49%	86%
細胞核	84%	70%
線維	40%	90%
糸球体細胞核	82%	80%
平均	63%	81%

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 0件)

[学会発表](計 6件)

[1] 橋本江美, 石川雅浩, 篠田一馬, 長谷川まどか, 駒形英樹, 小林直樹, 持留直樹, 岩本千佳, 大内田研宙, 小田義直, 橋爪誠, “スペクトル情報と色補正を用いた肝病理標本画像の組織分類”, 第36回日本医用画像工学会大会, Jul.2017.

[2] M.Ishikawa, T.Abe, A.Hashiguchi, M.Sakamoto, N.Kobayashi, “Extraction of glomerulus in whole slide imaging of kidney biopsy specimens”, SPIE Medical Imaging 2017 poster session, Feb 2017.

[3] E.Hashimoto, M.Ishikawa, K.Shinoda, M.Hasegawa, H.Komagata, N.Kobayashi, N.Mochidome, Y.Oda, K.Ohuchida, M.Hashizume, C.Iwamoto, “Tissue classification of liver pathological tissue specimens image using spectral features”, SPIE Medical Imaging 2017 poster session, Feb 2017.

[4] 石川雅浩, 橋本江美, 篠田一馬, 長谷川まどか, 加藤茂夫, 駒形英樹, 小林直樹,

“マルチスペクトル画像による色素量補正を用いたHE染色肝病理画像中の構造認識”, 2016年電子情報通信学会総合大会 情報・システム講演論文集2, 2016年3月15日.

[5] 橋本江美, 石川雅浩, 篠田一馬, 長谷川まどか, 加藤茂夫, 駒形英樹, 小林直樹, “マルチスペクトル画像を使用した肝病理組織標本の組織分類の検討”, 2016年電子情報通信学会総合大会 情報・システム講演論文集2, 2016年3月15日.

[6] 石川雅浩, 本田夏樹, 阿部時也, 橋口明典, 小林直樹, “EVG染色病理画像における糸球体構造認識”, 第12回日本病理学会カンファレンス, 2015年7月25日.

[7] 石川雅浩, 渡邊すみれ, 阿部時也, 橋口明典, 小林直樹, “腎生検画像における糸球体構造認識”, 医用画像情報学会平成26年度春季(第171回)大会, 2015年2月7日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 雅浩 (Masahiro Ishikawa)

埼玉医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号: 70540417

(3)連携研究者

阿部 時也 (Tokiya Abe)

慶應義塾大学医学部病理学教室

研究者番号: 10422552