

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24654025

研究課題名(和文) 組合せ不変量を用いた数理的組織判別法の開発

研究課題名(英文) Development of structure discriminants method by combinatorial invariants

研究代表者

中根 和昭 (Nakane, Kazuaki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10298804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織・鉄(Fe-C鋼)などの鉱物組織・高分子化合物のように、組織構成が全体の性質を決めることはよく見られる。組織の状態判別は、観察者の主観に任せられているのが現実である。判定結果は観察者の技量に大きく左右されるため、客観的な数値に置き換える手段が必要とされている。今回、組織判別に対して位相幾何学的な判定手法を用いたアルゴリズムを提案した。これは「組織構成要素の肥大による位相幾何学的性質の変化」を単純化された画像から読み取る、という原理であるが、組織形成の仕組みが同じような構造物は他にも多くある。それらにこの判定法を適用したが、非常によい結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We often found that, as Fe-C steels, mineral polymer compounds and cancer tissues, its structure determines the nature of the whole. Using a device such as a microscope, we observe the structures. The discrimination results of the structures depend on the skills of the observer. By introducing the objective methods, we should change this situation. The development of this kind of systems have been advanced by the methods based on the pattern recognition technology. Because the structures are very complex, any effective systems have not been developed. Here, we propose a completely new method. Our method reads "the state of the contacts" (the topological properties). Because structures are composed by the contact of elements, we can apply this method to many kind of structures. We have applied this to the several structures, we had very good numerical results.

研究分野：数物系化学

科研費の分科・細目：数学・数学一般

キーワード：ホモロジー 組織形成 画像解析

1. 研究開始当初の背景

癌組織・鉄 (Fe-C 鋼) などの鉱物組織・高分子化合物のように、ミクロの組織構成が全体の性質を決めることはよく見られる。ミクロ組織の状態判別は、観察者の主観に任せられているのが現実である。判定結果は観察者の技量に大きく左右されるため、客観的な数値に置き換える手段が必要とされている。今回、組織判別に対して位相幾何学的な判定手法を用いたアルゴリズムを提案した。これを癌組織に適用したところ、非常に良い結果が得られた。これは「組織構成要素の肥大による位相幾何学的性質の変化」を単純化された画像から読み取る、という原理であるが、組織形成の仕組みが同じような構造物は他にも多くある。それらにこの判定法を適用し、判定法の有用性を確認する。

2. 研究の目的

病理診断は、癌を発見するだけでなく、治療方針を決定する上で必要不可欠な医療行為である。病理医は、標本内に癌がどこにあるか分からないため、顕微鏡を用い標本にくまなく目を通す。見落としはそのまま患者の生命に関わる問題になるため、非常に神経を使う作業である。日本では病理診断を行うことができる病理医数は十分ではなく (年間 3000 万件の病理診断、2 万 2 千件の病理解剖を 2000 人弱の病理医が担当する) 病理医の常駐しない施設が大半である (全国 9000 近くある病院のうち、600 弱の施設のみに常勤している)。施設によっては病理診断が必要な時に迅速に行えない事態が生じ、処置に遅れをきたすなど、深刻な事態が生じる場合がある。病理医育成には長時間の訓練を必要とされるため、早急に病理医の数を増やすことは困難である。癌病理診断を支援する解析プログラムの開発は希求の要請であった。

これまでは「パターン認識技術」を基礎とした解析プログラムの研究が進められてきた。しかし、癌組織があまりに多様なため実用には適さなかった。

このような状況の中、パターン認識技術によらない癌病変部判定アルゴリズムを提案した。この判定アルゴリズムは、癌細胞の無秩序増殖による圧迫・浸潤を位相幾何学的な性質の変化として読み取るものである。現在までで大腸がんの組織画像に対して適用したところ、偽陰性 (見逃し) が非常に少なく (0 / 100) ライブラリー参照を行わないため、極めて短時間 (1 画像 1.0 秒未満) での判定が可能であった。

生体組織が正常な場合は、構成要素同士が適切な間隔 (接触・離散) を保ちながら全体としての機能を果たしているが、癌というシステムとしての統合的制御から逸脱した状態では、その関係が崩れる。これを、ホモロジーを応用した手法で読み取り判別を行っている。

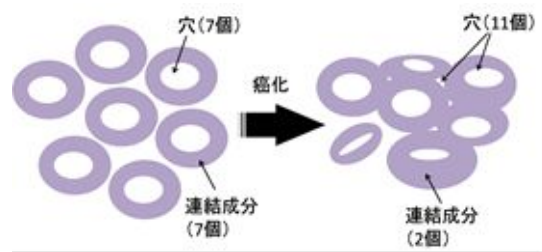


Fig. 1 癌化により集積 (接触) が多くなると、接触部分に隙間ができる。これをホモロジーで考えると、ベッチ数が極端に変化していることがわかる (左: 0 次元ベッチ数 = 7、1 次元ベッチ数 = 7、右: 0 次元ベッチ数 = 11、1 次元ベッチ数 = 2)

一般に組織といわれるものは、がん組織をはじめとして、一見規則的な法則により並んでないものが多い。人間はそれらの、配置・組織構成要素の形の分布などで判断しているが、病理診断同様、判定者の技量に大きく依存している。これを、一般性の高い数学を用いて記述できれば社会的にも大変有用である。提案したアルゴリズムは、原理的には『組織構成要素の肥大による、組織間の接触・離散』の変化を読み取っている。

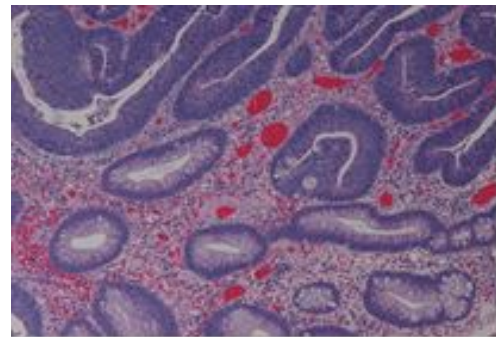


Fig. 2: 癌病変部を画像上部に含む画像



Fig. 3: 二値化画像

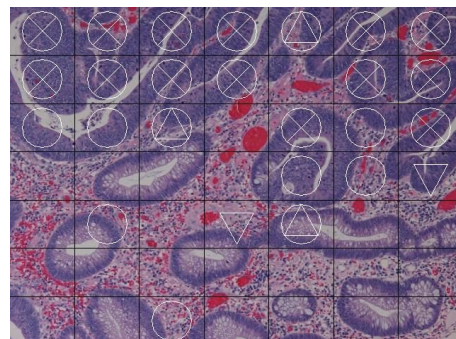


Fig. 4 判定結果 (○、●、×があるところが指標の高い部分)

今回の申請では、癌組織や金属組織 (Fe-C 鋼) をはじめとする、内部構成要素が肥大することによって形成される組織一般に対して、この手法がどの程度有効か、実験的・理論的の両面から考察を加えて行きたい。

3. 研究の方法

3-1. 数学的側面からの考察 (組合せ的位相幾何学・自己組織化)

本手法は組織を 100 倍 (接眼 10 倍 × 対物 10 倍) で撮影した画像に対して行っている。大腸癌の場合はこれを 7 × 7 に分割し、実験的に行った胃癌組織の場合は、14 × 14 に分割して行った。組織はその特徴を表現する『サイズ』がある。このため分割を変えなくてはならなかった (胃の組織のほうが大腸の組織より繊細である) と考えられる。

癌組織の多様性・複雑性は『組織構成要素の肥大』から生成されている。また同様な構成形態を持つ構造物は数多く存在する。組織の状態を、位相幾何学的な視点から数理的に表現する理論的な先鞭をつけたい。

3-2. 画像処理法の整備 (パラメータ設定など)

HE 染色の場合、色彩は各施設で異なる。これは、病理医の好みに左右される場合が多い。また、組織片がバラバラになった状態でスライドに載せられる場合もある。これが、パターン認識による判定方は非常に困難になる理由である。

これに対して本手法は、染色の状況をインターナルスタンダード (好中球など) から読み取り (サンプルパラメータと呼ぶ) 画像毎の色の分布から (画像パラメータと呼ぶ) 適切な二値化パラメータの設定を行う。

しかし、パラメータの決定に対して、効率化・正確さをさらに向上させなくてはならない。そこで画像処理の専門家らと議論し、最適な決定法を探索する。

3-3. 病理的な考察

本手法は大腸癌だけでなく、各種の癌 (固形癌) に対して適用できると考えられる。このため大阪大学大学院医学系研究科、大阪府立急性期病院、大阪府警察病院と連携をとり、多くの種類の癌に対してこの手法を適用していきたい。

このプログラムはバーチャルスライド (自動的に組織標本を撮影し電子画像として保存する装置) と組み合わせることで進化を發揮する。株式会社浜松ホトニクスはバーチャルスライドのメーカーとして国内シェアのトップの企業である。現在守秘義務契約を結び共同研究の端緒についたところである。また、計算の結果を臨床に役立てるためには、GUI の作成が必要不可欠である。医学関係者と共に GUI の開発を行いたい。

4. 研究成果

4-1. 数学的な考察について

組織と呼ばれるものには、生物の模様などの様に、ある程度の秩序をもって形成されるものがある。これらに関しては理論・実験の双方から研究が進んでいる。しかし、一般には、今回研究対象とする癌組織などの組織は、一見しただけでは法則性が見いだせず、数理的な記述が難しいものも多く存在する。このような組織に対して位相幾何学的な手法を用いて組織の分類を試みるわけだが、具体的には、組織を反映させるサイズ (単位面積) を定め、そこでの指標 (ベッチ数の関数) を定義して、組織の本質である接触を数値化するという原理である。この手法は二値化した画像から指標を計算するため、一般の計算機であっても極めて短時間で判定が可能である。またパターン認識技術とは異なり、ライブラリー参照を行わない。このため、ライブラリーを作成・アップデートするコストが必要ない。

これらの組織にはその組織構成要素には不規則な要因が含まれている。組織内においては、癌化は均一に行われる訳ではないため、どうしてもランダムな要因が含まれている。本手法はベッチ数を単位面積内で計算するため、全体的な傾向を把握できている。また、これらの指標は位相不変量 (topological invariance) であるため、微小な形態の変化に対してロバストなものになっている。

それを示すのが、次の例である。これは、ベアリング球の断面であり、左側が表面である。これに対しては加熱・冷却処理を行う。表面は急速に冷却されるため、結出する炭素結晶は棒状のものになり、非常に硬い性質を持つ (マルテンサイト)。これより内部に行くと炭素結晶が粒状になるが、内部に行くに従い冷却速度が落ちるため、粒が荒くなる (パイナイト)。硬さは粒子の大きさと同期する。



Fig. 5 ベアリング球の断面の写真。左からパイナイト (粒子がだんだんと細くなる)、右はフェライト (粒子の大きさがそろっている) 部分。

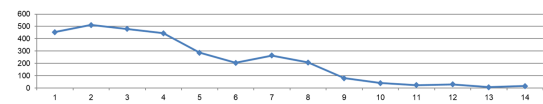


Fig. 6 画像を 14 × 2 に分割し、横一列の画像に対して 1 次元ベッチ数を縦軸にとったもの。なだらかに減少しているのが見て取れる。

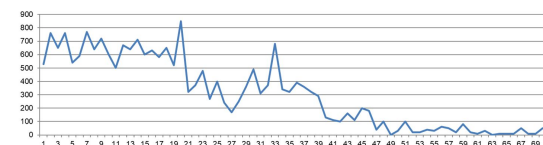


Fig. 7 画像を63×9に分割し、横一列の画像に対して1次元ベッチ数を縦軸にとったもの。全体の傾向として減少していくが、極端に多くなる部分がある。

Fig.6 と Fig.7 は分割の個数を変えただけである。Fig. 7 では、内部に行くに従い1次元ベッチ数が減少して聞く傾向は見取れるが、場所によっては極端に高くなる場合がある。しかし、Fig.6 を見ればそれが均されて、なだらかに変化している。

実際には、粒子は3次元で現れるが水平に切った場合、粒子のポリウムのどこを切っているか分からない。画像がある程度の大きさを持てば、それらが平均化されていることが分かる。観察者は、この平均的な変化を読み取っていると、考えられる。ちなみに、この粒子の大きさと硬度とは密接に関係しており、ホモロジー計算だけで、材料の硬度も判明する可能性がある。

4 - 2、画像処理法の整備

4-2-1 閾値の決定について

生体組織を染色するために、HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色という手法がよく使われる。ヘマトキシリンは青紫色の色素であり、具体的には細胞核、骨組織、軟骨組織の一部、漿液成分などが青く染まる。エオシンは、細胞質、軟部組織の結合組織、赤血球、線維素、内分泌顆粒などである。特に赤血球はエオシンを強く吸収して、明るい赤に染まる。癌は本質的には細胞核の変質であるため、変化が青の部分に特徴的に現れる。このため、画像をRGB分布で考えた場合、青を基準に二値化の閾値を定める。

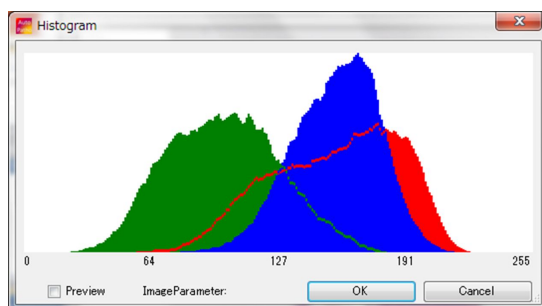


Fig.8 1視野におけるRGB分布。これらの分布の情報により、二値化の為の閾値は決定される。

4-2-2 ホワイトのバランス

HE染色の状態は、医療施設ごとに異なる。しかし、これは病理医の好みにもよる場合が多いため、簡単には標準化できない。そのため、計算機的に標準化する方法を考える必要がある。このため、以下の方法で標準顔w行う。

- ・サンプル全体から背景を一つ抽出する。
- ・これに標準的な手法で、偏差補正とホワイトバランスをとる。この際、ヒストグラムの重心で標準をとる。
- ・背景はRGBすべてを200としてとってあ

る。

- ・それに対してリニアに変換をして、そのデータがエクセルの表に書き出す。

これにより、現在3施設での標本に対して確認したが、染色状態によらない処理が可能となった。

4-2-3 低分化型の問題

癌の進行が進むと癌細胞は脱分化を起こす。これは、癌細胞が卵細胞のように組織形成を行わない状態になることである。このため、低分化型の組織は接触の程度は非常に低くこの手法だけでは、特定することが困難である。しかし、これらは核が大きくなるという特徴的な性質があるため、ホモロジーを計測するとともに核の大きさを計ることで特定が可能となる。

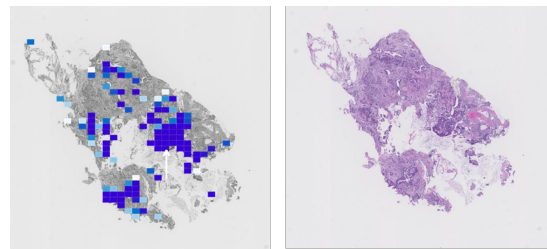


Fig.9 低分化癌組織（右）とその処理結果（左）核の大きな細胞がある部分に青いタイルを置いた。

4-2-4 疑陽性について

本手法での結果は以下の通りである。

	疾患有り(病理医)	疾患なし(病理医)
本手法陽性	378 (A)	82 (B)
本手法陰性	0 (C)	29 (D)
感度	100 (378/378)	
特異度	26.1 (29/111)	
偽陽性率	73.9 (82/111)	
偽陰性率	0 (0/378)	

Table 1 .処理結果。偽陽性が多いものの(73.9%)偽陰性はほとんどない。"Introduction of a cancer tissue detection method via homology" to appear (Computerized Medical Imaging and Graphics)

偽陰性はほとんどないものの、偽陽性の割合が高い。これは、本手法が「組織の集密度の分布」を見ているため、リンパ濾胞・好中球の集積・線維化部分などの、集積部分を癌としてカウントしてしまうからである。しかし、これらの組織は特徴的であるため、別のアルゴリズムによりこれらを排除していきたい。

4 - 3、病理的な考察

本手法を各種癌について適用したところ、非常に有望であることが判明した。今後さらなる研究により、より多くの癌種について適用可能となると思われる。

しかし、この手法では難しい例も存在する。それは、印環細胞癌である。これは、組織の中に水滴のように浮かぶものであり、一般の

病理医でも見逃す場合もある。今回大腸がんで確認したため印環細胞癌は現れなかったため、偽陰性が低くなっているが、胃がんなどほかの部位では、これがよく現れるため、部位を拡張する場合は、病理医とのディスカッションを経て慎重に臨むべきだと考える。

4 - 4、他の組織への応用

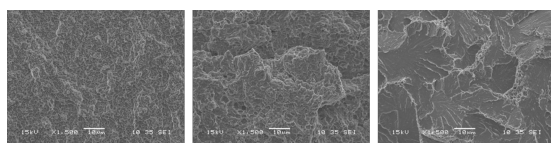
組織とはそもそも組織構成要素間の接触により形成される。そのため、本手法の応用範囲は広い。

4-4-1. 破断面に対する応用

橋梁などの人工構造物や船舶・航空機は、近代社会の発展とともに新規開発・改善がなされてきている。しかし、疲労破壊による事故は、重要な社会インフラにとどまらず多くの人命を奪っている。この事故の原因調査を行う上で、破壊形態を分類整理するフラクトグラフィと呼ばれる研究分野が発展しており、携わる技術者の専門知識・研究によって蓄積されたデータベースは破断面、ひいては事故の解析に必要な不可欠となっている。特に急速破断部分・疲労破断部分の判別により、事故の原因を究明することは新聞紙面を例にとってもわかるように一般的に受け入れられている。

破断面は、振動や応力振幅の繰返しにより応力集中部に生じる塑性変形の領域が移動拡大することにより形成されるため、方程式による記述は難しい。破断面の判別は技術者の観察により行われるが、計算機を用いた客観的指標による定量化は大きな課題である。しかし、組織構成にランダムな要因が入るため、一般の画像解析手法は通用しない。

破断面は、振幅が大きければ拡大速度が速くなり、破断面の凹凸は粗くなる。これを、ホモロジー手法を適用して、インデックス化に成功した。



Fatigue fracture ← Rapid fracture

左から、疲労破断面、荷重をかけた破断面、急速破断面、右に行くに従い組織が粗くなるのが分かる。

	Fig4	Fig5	Fig6
component	2290	2466	2144
loop	262	164	123
ratio	0.11441	0.0665045	0.0573694

Loop と書かれた欄は、1次元ベッチ数である。これが大きいほど組織が細かい。

4-4-2. 溶接による組織変性

溶接する際に、溶接部分の周辺は温度が均等にかかるため、まるで焼き入れが行われた状態になり、強度が増す。これは、焼き入れ

の為、フェライト上の炭素結晶が減るためと考えられている。フェライト部分が減少する事を評価するためにはやはりベッチ数を計測すればいい。

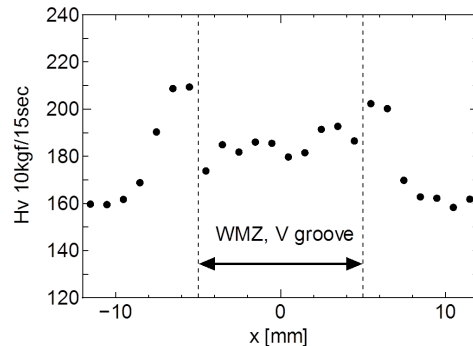


Fig. 10 溶接領域を含む周辺部の材料硬度のグラフ。真ん中が溶接部(WMZ)であるが、その周辺部に極端に硬度が上がっている部分があるのが見て取れる。



Fig. 11 粒子の模式図である。左の部分はフェライトで層状構造を持っている。右はそれがつぶれた粒子である。破断は通常層状組織がつぶれることにより始まる。

	Substrate	HAZ	WMZ
component	79	268	286
loop	110	43	100
ratio	1.3924	0.16044	0.34965

Table 2 ホモロジー計算の結果。周辺部(Substrate)・溶接部(WMZ)では、1次元ベッチ数(この場合はLoopと記述)の数は、大きくなっているが、周辺部(HAZ)では非常に少なくなっている。これは、フェライトの層構造が壊れている状態を定量評価しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

- 5-1 K. Nakane, Takashi Honda, E. C. Santos and K. Kida : Topological difference of grain composition in the WMZ (Weld Metal Zone) in low carbon steel Plates, (JIS-SS400) Proc. New Methods of Damage And Failure Analysis of Structural Parts, pp.271-277.
- 5-2 K. Nakane, Y. Tsuchihashi and N. Matsuura A Simple Mathematical Model Utilizing Topological Invariants for Automatic Detection of Tumor Areas in Digital Tissue Images, Diagnostic Pathology, 2013, 8 (Suppl 1).
- 5-3 K. Nakane, K. Kida and K. Mizobe Homology analysis of prior austenite grain size of SAE52100 bearing steel processed by cyclic heat treatment, Advanced Materials Research, Vol. 813 pp 116-119.
- 5-4 K. Nakane, K. Mizobe and K. Kida

Homology estimate of grain size measurement based on the JIS samples, Applied Mechanics and Materials, Vol. 372, pp 116-119.

- 5-5 K. Nakane, E. C. Santos, T. Honda, K. Mizobe and K. Kida, Homology Analysis of Structure of high carbon bearing steel: Effect of Repeated quenching on Prior Austenite Grain Size publishing, ISSN: 1433-075X) Materials Research Innovations.
- 5-6 C. D. Hung, K. Nakane, T. Ito and I. Hashimoto, Classification of capillary images based on the average curvature estimation, Science report of Kanazawa University, vol.56, 35-44.
- 5-7 K. Nakane and Y. Tsuchihashi Introduction of a cancer tissue detection method via homology, Computerized Medical Imaging and Graphics (to appear).
- 5-8 中根 和昭
第 10 回生物数学の理論とその応用
癌病画像診断の自動化について、
京都大学数理研紀要 (to appear).

(Keynote Speech)

- 5-9 K. Nakane, Quantitative evaluation of the organization by using the homology International conference on Metallurgy Technology and materials (2013.6.).
- 5-10 K. Nakane, Influence of repeated quenching on bearing steel martensitic structure investigated by homology International Conference on Metallurgy Technology and Materials (ICMTM 2013) (2013.5.).
- 5-11 K. Nakane, An approach to tissue analysis via topological method 2nd International Conference on Advance Materials Design and Mechanics (ICAMDM2013) (2012.5)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中根 和昭 (NAKANE, Kazuaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授
研究者番号 : 10298804

(2)研究分担者

末松 信彦 (SUEMATSU, Nobuhiko)
明治大学先端数理科学インスティテュート・講師
研究者番号 : 80542274