

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17104
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K14150
研究課題名（和文）局所空間相関長は定量位相画像に基づくラベルフリー組織診の有効なマーカーとなるか

研究課題名（英文）Is local correlation length of quantitative phase image useful marker for label-free tissue diagnosis?

研究代表者
高林 正典（Takabayashi, Masanori）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：70636000
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：染色が不要で、かつ定量的な診断が可能なラベルフリー組織診断技術である「定量位相イメージングを用いたデジタル組織診断」において、ナノスケールの構造変化を抽出可能なマーカーとして定量位相画像の空間自己相関長を用いることを新たに提案した。乳がん組織の良性-悪性判別を行い、空間自己相関長マップの平均対標準偏差値が良性、悪性グレード1, 2, 3の非隣接グレード間識別に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、定量位相画像の空間自己相関長は乳がん組織の良性-悪性診断に有用であることが示された。今後は機械学習等の発展も手伝い、複数のマーカーを複合的に用いた多角的な診断が要求されると予想される。その点で、新たな病理マーカーを確立できたことの学術的意義は大きく、また、本研究が目指す簡単に正確な診断技術が支える医療社会の実現に向けた社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：In digital tissue diagnosis using quantitative phase imaging, which is label-free and quantitative tissue diagnosis technique, we proposed to use local correlation length of quantitative phase images as a marker of nanoscale morphological changes. The benign-malignant diagnosis of breast cancer tissue was performed, and the ratio of mean and standard deviation of the spatial autocorrelation length was able to discriminate between nonadjacent grades of benign and malignant grades 1, 2 and 3.

研究分野：光工学

キーワード：定量位相イメージング デジタル組織診断

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織診断は病気の診断や手術の方針決定において極めて重要な病理診断方法の一つであり、患部から摘出した組織をスライス・染色した標本を光学顕微鏡によって観察し、病理診断士が知識と経験に基づき診断を下すものである。ここで、「染色」のプロセスは、ほとんど光を吸収・散乱しない“透明な”組織スライスを一般的に用いられる明視野顕微鏡で観察するために必要となる。このような診断手順は100年以上続く“確立された”ものであるが、染色品質のばらつきや定性的な基準に基づく診断は判断のばらつきを引き起こす恐れがある。

そこで注目を集めているのが定量位相イメージングを用いた組織診断である。定量位相イメージングは物体の空間的な屈折率や厚さの変化によって引き起こされる光波の空間的な位相変化を定量的に計測可能な技術であり、染色をしていない組織でも形状に関する情報を定量的に抽出することができる。組織スライスをそのまま定量位相イメージングで観察して得られた定量位相マップから特徴量を抽出し、それを用いて診断する。染色をする必要がないので染色品質のばらつきの問題からは解放され、また、定量的な診断が可能になることから判断のばらつきも最小限にすることができるという利点がある。

定量位相イメージングを用いた組織診断の精度を決定するのは抽出する特徴量、つまり病理マーカーである。これまで定量位相マップから抽出可能なマーカーが複数提案されている。例えば、定量位相マップから抽出可能な光散乱パラメータである平均散乱自由行程や異方性パラメータを用いた組織診断のデモンストレーション結果が報告されている。また、最近特に注目されているマーカーにナノスケール構造変化マーカーがある。ごく微小な領域内で起こる構造変化を検知するマーカーであり、高い位相感度を有する定量位相イメージングによって抽出可能である。代表的なナノスケール構造変化マーカーに Disorder strength (DS)があり、乳がん組織の良性悪性間スクリーニングに使用可能であることが報告されている [Masanori Takabayashi, et. al., PLOS ONE 13, e0194320 (2018)]. 同時に、DSの計算には時間がかかるほか、それ単独では細かな悪性グレード間の識別ができないことが分かっている。

2. 研究の目的

本研究では、DSよりも短時間で抽出可能で、DSよりも、またはDSと組み合わせることによってスクリーニング精度の向上につながる新たなナノスケール構造変化マーカー提案する。具体的には、定量位相画像の局所空間相関長を新たなナノスケール構造変化マーカーとすることを提案し、これがラベルフリー組織診のマーカーとして有用かどうかを明らかにすることを目的とする。具体的には、局所空間相関長の高速計算手法を提案した上で、それが良性および悪性の乳がん組織スクリーニングに有用であることを統計的に示す。結果として、短時間で計算可能なラベルフリー組織診用マーカーが新たに利用可能になることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、(A) 定量位相イメージングシステムの構築と定量位相画像の取得、(B) 局所空間相関長の高速計算法の提案と実装、(C) 良性および悪性乳がん組織のスクリーニング評価を2年間の計画で行う。

(A) 定量位相イメージングシステムの構築と定量位相画像の取得

定量位相イメージングシステムとして Spatial Light Interference Microscopy (SLIM) を構築する [Z. Wang et. al., Opt. Exp. 19, 1016 (2011)]. 数ある定量位相イメージング技術の中から SLIM を採用する理由は、白色光源を用いるためスペックルノイズが発生しないこと、物体光と参照光が同軸を伝搬するため振動などに対する耐性が高いことである。SLIMの光学系は、図1に示すように、市販の位相差顕微鏡の部分と、主に空間光変調器とミラー、カメラからなる SLIM モジュールの部分からなる。位相差顕微鏡は購入し、SLIM モジュールは申請者が構築する。サンプルは一定の厚さを有する乳がんの組織アレイを使用する。また、一般的に試料の大きさは顕微鏡の視野よりも大きいので、スキャンしながら複数の画像を取得し、それを自動で結合できるようにソフトウェアも同時に開発する。

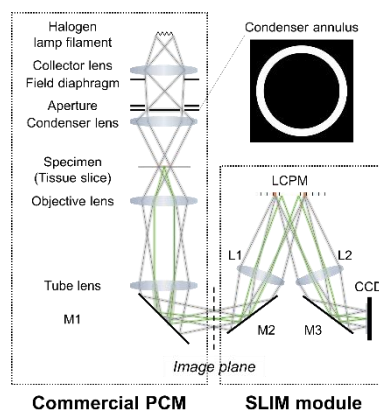


図1 SLIMの光学系

(B) 局所空間相関長の高速計算法の提案と実装

(A) で得られた定量位相画像のそれぞれについて、局所空間相関長マップを計算によって求める。空間相関長は、Wiener-Khinchin 定理に基づいて計算されることが一般的だが、1 領域に対して複数回のフーリエ変換を行う必要があるため、空間相関長を局所領域ごとに計算するには膨大な時間を要する。そこで、空間相関長を正規化空間自己相関関数の標準偏差と定義し、それを空間周波数領域で演算することによって現実的な計算時間で計算を実現する方法を提案する。従来手法と提案手法をそれぞれ MATLAB によって実装し、計算結果と計算に要する時間を比較する。また、他のマーカーである DS の計算も同条件下で行い、計算時間を比較することで、局所空間相関長が従来のマーカーよりも高速に計算できることを定量的に示す。

(C) 良性および悪性乳がん組織のスクリーニング評価

(B) で得られた局所空間相関長マップから、組織ごとの平均局所空間相関長を算出する。このとき、局所空間相関長マップの全てのピクセルを平均すると本来組織とは関係のない背景領域の局所空間相関長も含まれてしまうことを避けるために必要なピクセルのみを平均に含める必要がある。ここでは、一定値以下の定量位相値を有するピクセルを除外する方法と、一定値以下の局所空間相関長を有するピクセルを除外する方法を試す。それぞれの方法についてしきい値を変えながら、30 対 30 のサンプルの平均局所相関長に統計的な優位差があるかを検定する。検定には、ウィルコクソンの順位和検定 (two-sided Wilcoxon ranksum test, U-test) を用い、統計的に優位差があると判断する基準 $p < 0.05$ を根拠として、本研究の目的である「定量位相画像の局所空間自己相関長はラベルフリー組織診のマーカーとして利用できるか」について議論する。

4. 研究成果

(A) 定量位相イメージングシステムの構築と定量位相画像の取得

Spatial Light Interference Microscopy (SLIM) を構築するとともに (図 2)、撮影から演算を 1 クリックで行えるようなソフトウェアを作成した (図 3)。SLIM の取得から演算に至るまでの一連の動作自体は問題なくできたが、定量位相マップの正確性には課題が残ったため、以下の研究では、自前で構築した SLIM による取得画像を用いるのではなく、協力研究者である米・イリノイ大学アーバナシャンペーン校の Gabriel Popescu 教授提供の胸部組織定量位相マップを使用した (事前にインフォームドコンセントを得た試料のみを使用)。精度の改善については研究期間終了後も継続して行っていく。



図 2 構築した SLIM

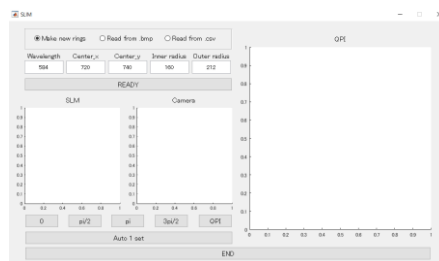


図 3 作成した GUI ソフトウェア

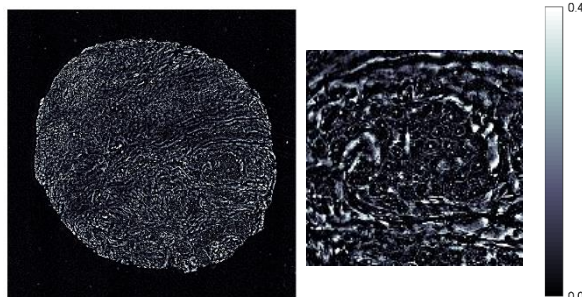


図 4 使用した胸部組織スライスの定量位相マップ

(B) 局所空間相関長の高速計算法の提案と実装

組織の定量位相画像の各微小領域における空間自己相関長を現実的な計算量で求めるために、空間自己相関長を以下のように正規化された空間自己相関関数の標準偏差として以下のように計算できることを示した [M. Takabayashi et. al., J Biomed. Opt. 24, 016502 (2019)].

$$\rho(x', y') = \frac{\iint (x^2 + y^2) \Gamma(x, y; x', y') dx dy}{\iint \Gamma(x, y; x', y') dx dy}$$

$$= 2\pi \sqrt{\frac{\iint |t(x, y; x', y')|^2 dk_x dk_y}{\iint \left| \frac{\partial}{\partial x} t(x, y; x', y') \right|^2 + \left| \frac{\partial}{\partial y} t(x, y; x', y') \right|^2 dk_x dk_y}}$$

ここで、 $\Gamma(x, y; x', y')$ は $\phi(x, y)$ の (x', y') に中心を持つ一辺 a ピクセルの正方形領域の空間自己相関関数、

$$\Gamma(x, y; x', y') = t(x, y; x', y') \otimes t(x, y; x', y')$$

であり、また、

$$t(x, y; x', y') = [\phi(x, y; x', y') - \phi_{mean}(x', y')] \times rect\left(\frac{x-x'}{a}\right) rect\left(\frac{y-y'}{a}\right)$$

$\phi_{mean}(x', y')$ は局所領域内の平均位相である。ここで、 $\tau(x', y')$ は $\Gamma(x, y; x', y')$ をフーリエ変換した関数 $I(k_x, k_y; x', y')$ の自己相関長である。この関係を図 5 に示す。

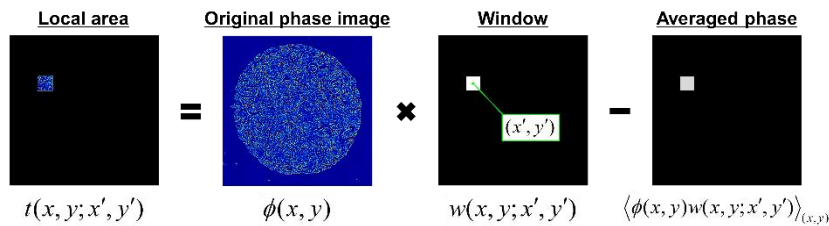


図 5 Local correlation length における局所領域

上で導出した式を用いて実際に局所空間自己相関長マップを計算した例を図 6 に示す。なお、当該マップの計算は、局所領域サイズが異なる場合は直接の比較が困難であるが、概ね DS の計算に要する時間よりも短い時間で行うことができた。同程度の局所領域サイズでは約 20-30%の低減効果が確認された。

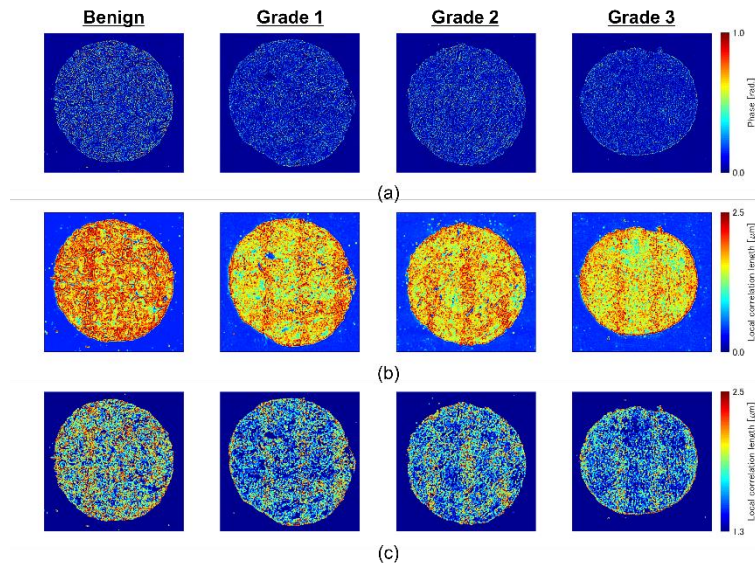


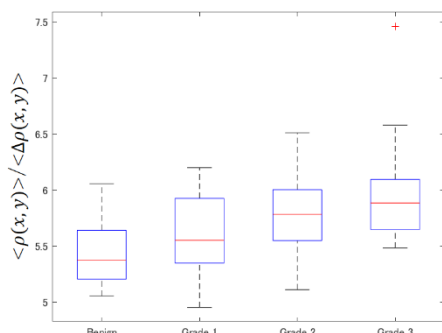
図 6 空間自己相関長マップ。(a)定量位相マップ、(b)空間自己相関長マップ、(c)背景ピクセル等の不要箇所を除去した空間自己相関長マップ

(C) 良性および悪性乳がん組織のスクリーニング評価

(B) で得た乳がん組織の空間自己相関長マップから評価値を計算し、良性と悪性の識別に使用可能かどうかを調査した。サンプルは、良性組織 (B: Benign) を 20 種類、悪性組織 (M: Malignant) を 46 種類用いる。さらに悪性組織は、それぞれ 16, 16, 14 種類のグレード 1 (G1)、グレード 2 (G2)、グレード 3 (G3) からなる。グレード間識別判定においては、Wilcoxon の両側順位和検定を行って得られた p 値を用い、 $p < 0.05$ を満たしたときに識別可能であるとした。図 7 および表 1 は、評価値として空間自己相関長マップの平均対標準偏差値を用いた場合の結果である [M. Takabayashi et. al., J Biomed. Opt. 24, 016502 (2019).]. 平均対標準偏差値を用

いたのはいくつかの候補から試行錯誤的に決定したためであるが、その後の詳細な調査によって、平均値よりも標準偏差値、また、それを単独で用いるよりも平均対標準偏差値を用いる方が高い識別精度を達成できることが分かった [座小田聖, 國居弘樹, 高林正典, 第 80 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集 DVD, 19p-E319-21, 2019 年]. 表 1 を見ると, ほとんどのグレード間識別が実現できていることが分かる. このことから, 本研究題目でもある「局所空間相関長は定量位相画像に基づくラベルフリー組織診の有効なマーカーとなるか」という問いに対しては「有効なマーカーとなる」と答えることができるだろうと考えられる. しかし一方で, B-G1, G1-G2, G2-G3 の隣接するグレード間の識別において $p > 0.05$ となっており, 識別できていないことが分かる.

表 1 各グレード間の p 値



Grades to be evaluated	p-value
Benign—Malignant (G1, G2, G3)	0.000876
Benign and Malignant (G1)—Malignant (G2, G3)	0.000335
Benign—Malignant (G1)	0.101101
Benign—Malignant (G2)	0.005891
Benign—Malignant (G3)	0.000498
Malignant (G1)—Malignant (G2)	0.193509
Malignant (G1)—Malignant (G3)	0.018837
Malignant (G2)—Malignant (G3)	0.417581

図 7 平均対標準偏差値による識別結果

今後は, 隣接グレード間の識別が課題となる. 本研究課題の期間内に行った結果によると, 空間自己相関長を単独として用いるよりも, 同じナノスケール構造変化マーカーとして提案されている DS を同時に用いる方が高い識別精度を達成できることが分かった [森直人, 高林正典, 第 80 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集 DVD, 19p-E319-20, 2019 年]. そのため今後は, ナノスケール構造変化マーカーに限らない複数のマーカーを適切に組み合わせた識別方法について検討していく. 特に, 機械学習によるアプローチを導入し, より高い精度で診断を行えるようにする予定である [基盤研究 C : 20K05362].

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takabayashi Masanori, Majeed Hassaan, Kajdacsy-Balla Andre, Popescu Gabriel	4. 巻 24
2. 論文標題 Tissue spatial correlation as cancer marker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.JBO.24.1.016502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takabayashi Masanori, Majeed Hassaan, Kajdacsy-Balla Andre, Popescu Gabriel
2. 発表標題 Tissue Diagnosis Using Nanoscale Morphological Information Revealed by Quantitative Phase Imaging
3. 学会等名 International Symposium on Imaging, Sensing and Optical Memory（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takabayashi Masanori, Majeed Hassaan, Kajdacsy-Balla Andre, Popescu Gabriel
2. 発表標題 Tissue diagnosis using nanoscale morphological markers extracted from quantitative phase images
3. 学会等名 Photonics Asia 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高林正典
2. 発表標題 定量位相イメージングによるデジタル病理診断
3. 学会等名 2019年度第1回フォトニクス技術フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 座小田聖, 國居弘樹, 高林 正典
2. 発表標題 定量位相画像の空間自己相関長を用いた乳がん組織診断: 空間自己相関長の抽出条件が識別精度に及ぼす影響の調査
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高林研究室 http://ba84.webcrow.jp/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考