

論文内容の要旨

肝生検組織の脂肪変性定量化の試み

- 非アルコール性脂性肝疾患でのバーチャルスライドを用いた画像解析検討 -

(川口順三, 増田友之)

(岩手医学雑誌 72 巻, 2 号 令和 2 年 6 月掲載予定)

I. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患は主として肝生検により診断され、治療や予後予測に頻用されている。その評価には脂肪変性に陥った領域の広さ、炎症の程度、線維化の有無が主に使用されている。形態観察による脂肪変性領域の評価は主観が入りやすく、客観的な計測方法の確立が望まれる。より正確に施設間の評価の誤差を少なくする目的で、バーチャルスライドを用いて、肝生検での脂肪化率定量化を試みた。

II. 研究対象ならび方法

1. 材料

岩手医科大学病理学講座に提出された肝生検症例のうち、NASH (nonalcoholic steatohepatitis)あるいはNAFL (nonalcoholic fatty liver)と考えられた症例のうち 22 例を無作為に抽出した。生検材料はエコーガイド下で採取後、10%ホルマリン溶液に浸漬し、アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、3 μ m の切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

2. 方法

HE 染色標本を鏡し、おおよその脂肪化率を目視で記録した。日本肝臓学会推奨のガイドラインに準拠し、脂肪化率を 5%から 10%、それ以上は 10%刻みで評価した。二人の観察者で評価し、その平均を求めた。

デジタルスライドスキャナー装置 (浜松フォトニクス社製 Nanozoomer 浜松, 日本) で 20 倍の対物レンズを使用してバーチャルスライド画像を作成した。撮影されたファイル (ndpi ファイル形式) を、画像解析ソフト (3Dhistech 社製 HistoQuant Ver. 2.0) で取り扱えるファイル形式 (MRSX ファイル形式) にファイル変換ソフト (3Dhistech 社製 SlideConverter Ver. 1.14) を用いて変換した。画像は染色濃度に応じて、各画素点で RGB それぞれ 0 から 255 段階の数値 (濃度) でデジタル化され、この RGB の濃度値の組み合わせで色調が決まる。この RGB の色調成分で、組織全体と脂肪細胞領域を背景から分離した。肝臓の針生検検体は微小なため、検体中に大きな門脈域、中心静脈が存在すると肝細胞からなる実質域が相対的に小さくなる可能性がある。そのため、大きな門脈域、中心静脈は計測から外す計測法を考案し用いた。

分離された領域の画素点の総数から個々の組織と脂肪滴の面積を算出した。20 倍の対物レンズを用いた際は 1 画素が $0.45\ \mu\text{m}$ に相当するので、1 画素 0.45×0.45 が面積 (μm^2) として算出される。最終的に脂肪化率は下記の式で算出した。

脂肪化率 = 脂肪変性肝細胞領域総面積 / 肝組織領域面積
得られた値は 100 をかけて % で表現した。

使用した画像解析ソフトに組み込まれているパラメーターを下記に記す。

粒子分離機能(separation)：接触している脂肪細胞は一つの細胞として計測されて、面積が大きくなり形状係数は小さくなる。正確な計測をするために粒子分離機能を用いて接触している細胞を個々に分離した。

形状係数(shape)： $4\pi \times \text{面積} / (\text{周囲長} \times \text{周囲長})$ で計算される 0 から 1 までの無次元の数値で、粒子の円形度を示す指標である。脂肪細胞は球形に近いのでこの数値が他の組織より大きな値となる。

III. 研究結果

最初に画像解析ソフトに組み込まれている種々のパラメーターを用いて、脂肪変性肝細胞領域を自動的にどこまで正確に抽出できるかを検討した。

画像はノイズ除去を目的にメディアンフィルターによる平滑処理により数画素のカメラノイズを除去した。次に RGB の値で染色濃度の閾値を設定した。事前の検討で、脂肪変性領域は背景の組織の存在しない白い領域とほぼ同様の濃度値を示したので、背景の白濃度と同様の濃度を示す肝細胞内を脂肪変性領域とし、それ以外の濃度を組織領域とした。結果、R と B は閾値を全域 (0-255) とし、G の濃度の調節で組織領域と脂肪変性領域を含む背景領域を識別しえた。

次に抽出した画像から面積、形状係数等のパラメーターを用いて、どれだけ正確に脂肪変性領域とその他の背景領域を抽出できるかを検討した。抽出した領域には脂肪変性領域と大きな門脈、中心静脈と針生検組織の存在しない領域から構成されている。脂肪変性領域と生検組織の存在しない領域を比較すると脂肪変性領域の面積が圧倒的に小さい。事前の検討で、脂肪変性を示す個々の脂肪変性細胞の最大値は 975 から 5,485 μm^2 の間に分布していたことから、脂肪変性領域の最大値を 6,000 μm^2 に設定すると全ての症例で脂肪変性細胞を背景領域から識別することが可能であった。更に脂肪変性領域をより正確に判定するために粒子自動分離機能(separation)と形状係数(shape)を用いて検討した。その結果、separation を 1、shape を 0.5 以上に設定するとほぼ全ての脂肪変性領域を識別できた。

肝生検材料の組織学では、脂肪変性に陥った細胞(fatty degeneration; steatosis)と水腫変性(ballooning)を区別して用いているので、両者を識別することができるかについても検討した。脂肪変性と水腫変性は面積と形状係数を用いることで識別することが可能であった。その後、自動操作で識別できなかった門脈域、中心静脈をコンピューターマウスを使用して、手動にてとり除く操作を行った。手動操作にて正確に脂肪変性領域を抽出した場合と自動操作のみにて抽出し得た脂肪変性領域の差は 1% (range 0.0-0.3%) 以内であり、自動抽出だけでも十分に正確な値が得られることを確認した。

脂肪化率は 1-34% (中央値 10%) まで分布していた。目視で計測した脂肪化率と画像解析の値を比較すると、画像解析による脂肪化率の値は目視より遙かに小さな値であり、その差は 3-52% (中央値 25%) に分布していた。測定者を代えて 2 回 G 濃度値を設定したが、測定結果の差は 1% (range 0.1-1.0%) 以内であった。

IV. 結 語

より正確に施設間の評価の誤差を少なくする目的で、バーチャルスライドを用いて、肝生検での脂肪化率定量化を試みた。背景領域から脂肪変性細胞を抽出するために各種パラメーターを用いて検討した結果、ほぼ正確に脂肪変性細胞面積を計測し得た。目視による評価とバーチャルスライドを使用する評価を比較すると形態観察による計測結果は遙かに過大評価されていることが示された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所腫瘍生物学研究部門)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座：機能病態学分野)

食事の欧米化に伴う我が国における肥満の増加は、生活習慣病の危険因子となっている。中でも肥満と関係し肝機能悪化を招く非アルコール性脂肪性肝疾患は今後克服せねばならない重要な疾患となっている。非アルコール性脂肪性肝疾患は、病態の進行が稀な疾患である非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)と、肝硬変、肝がんに進行する恐れのある非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)に分けられる。非アルコール性脂肪性肝疾患の診断は肝生検による組織学的検索により確定される。肝生検では、脂肪変性に陥った肝細胞領域の広さ、炎症の程度、線維化の程度が評価される。脂肪変性に陥った肝細胞領域の広さの評価は半定量的で、観察者の目視での主観的な要素に依存しており、客観的な計測方法の開発が必要である。本研究論文では、岩手医科大学病理学講座に提出された肝生検標本のうち、NAFL あるいは NASH と診断された 22 例の HE 標本について、バーチャルスライドを用いた画像解析法により、肝細胞の脂肪変性の定量化を行った。背景領域から脂肪変性肝細胞を各種パラメーターを用いて抽出したところ、肝細胞の脂肪変性を客観的に定量化することが可能であった。さらに、目視による脂肪変性の評価は、画像解析による評価と比較し過大に評価されていたことが示された。本研究の成果は、今後増加することが予測される非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解析にあたり、基礎的なデータを提供しており、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患の病態に加えて、バーチャルスライドを用いた画像解析法の詳細について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識と研究者としての指導能力を認めた。また、学位論文の作成にあたり、剽窃・盗作等の研究不正が無いことも確認した。

参考論文

- 1) How thick are the paraffin-embedded tissue sections routinely prepared in laboratory?
A morphometric study using a confocal laser scanning microscope (研究室で日頃薄切している切片の厚さはいかほどか? レーザースキャン顕微鏡を用いた形態計測学的研究) (増田 友之, 他 5 名と共著)
Pathology International, 48 巻, 1998: p179-183.
- 2) Three-dimensional examination of hepatic stellate cells in rat liver and response to endothelin-1 using confocal laser scanning microscopy (ラット星細胞のエンドセリン 1 に対する反応-コンフォーカル顕微鏡を用いた 3 次元的研究) (及川 浩樹, 他 2 名と共著) Journal of Gastroenterology and Hepatology, 17 巻, 2002: p861-872.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所腫瘍生物学研究部門)

副査 教授 増田 友之 (病理学講座：機能病態学分野)

食事の欧米化に伴う我が国における肥満の増加は、生活習慣病の危険因子となっている。中でも肥満と関係し肝機能悪化を招く非アルコール性脂肪性肝疾患は今後克服せねばならない重要な疾患となっている。非アルコール性脂肪性肝疾患は、病態の進行が稀な疾患である非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)と、肝硬変、肝がんに進行する恐れのある非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)に分けられる。非アルコール性脂肪性肝疾患の診断は肝生検による組織学的検索により確定される。肝生検では、脂肪変性に陥った肝細胞領域の広さ、炎症の程度、線維化の程度が評価される。脂肪変性に陥った肝細胞領域の広さの評価は半定量的で、観察者の目視での主観的な要素に依存しており、客観的な計測方法の開発が必要である。本研究論文では、岩手医科大学病理学講座に提出された肝生検標本のうち、NAFLあるいはNASHと診断された22例のHE標本について、バーチャルスライドを用いた画像解析法により、肝細胞の脂肪変性の定量化を行った。背景領域から脂肪変性肝細胞を各種パラメーターを用いて抽出したところ、肝細胞の脂肪変性を客観的に定量化することが可能であった。さらに、目視による脂肪変性の評価は、画像解析による評価と比較し過大に評価されていたことが示された。本研究の成果は、今後増加することが予測される非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解析にあたり、基礎的なデータを提供しており、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患の病態に加えて、バーチャルスライドを用いた画像解析法の詳細について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識と研究者としての指導能力を認めた。また、学位論文の作成にあたり、剽窃・盗作等の研究不正が無いことも確認した。

参考論文

- 1) How thick are the paraffin-embedded tissue sections routinely prepared in laboratory?
A morphometric study using a confocal laser scanning microscope (研究室で日頃薄切している切片の厚さはいかほどか? レーザースキャン顕微鏡を用いた形態計測学的研究) (増田 友之, 他 5 名と共著)
Pathology International, 48 巻, 1998: p179-183.
- 2) Three-dimensional examination of hepatic stellate cells in rat liver and response to endothelin-1 using confocal laser scanning microscopy (ラット星細胞のエンドセリン 1 に対する反応-コンフォーカル顕微鏡を用いた 3 次元的研究) (及川 浩樹, 他 2 名と共著) Journal of Gastroenterology and Hepatology, 17 巻, 2002: p861-872.