

肝生検組織の脂肪変性定量化の試み
- 非アルコール性脂肪性肝疾患における
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

岩手医科大学医学部, 病理学講座機能病態学分野

(Received on January 9, 2020 & Accepted on February 12, 2020)

要旨

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. 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.

Key words : *nonalcoholic fatty liver disease, liver biopsy, image analysis, virtual microscopy*

I. 緒 言

我が国に於ける食事の欧米化, 肥満の増加は様々な生活習慣病を惹起している. 中でも肥満に伴い肝機能悪化を招く非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) は今後の我が国が克服せねばならない重要な疾患のひとつとなっている. NAFLD は病態の進行が希な疾患である非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver: NAFL) と, 肝硬変や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. 同病態の診断は血液検査, 腹部超音波診断等, 病態進

行状況によってある程度の予測が可能であるが, 確定診断は肝組織の組織学的検索, 肝生検によってなされている¹⁾. 肝生検にあたっては脂肪変性に陥った肝細胞の領域の広さ, 炎症像の有無, 線維化の程度等を目安に組織学的診断が行われているのが現状である^{2,3)}. 脂肪変性に陥った肝細胞領域の広さの判断は半定量的であり, 観察者の主観的な要素が入り込みやすく, 客観的な指標の開発が望まれる.

近年のテクノロジーの進化により, デジタルスライドスキャナーを用いたバーチャルスライド解析が進んでおり, 教育, 研究, 診療に活用されている. バーチャルスライドは 20 倍から 40 倍の対物レンズを用いて, スライドグラス上をスキャンし, 電子化ファイルとして撮りこむ装置で, IT 領域の進歩と共に, 病理学領域

Corresponding author: Tomoyuki Masuda
tmasuda@iwate-med.ac.jp

では病理診断, 離れた観察者間の病理画像コンサルテーション, 遠隔病理診断等に頻用されるようになった^{4,6)}. 得られた病理画像はそれぞれの画素がRGB 3原色の濃度値を持っているため, 画像解析にも適している. 今回, 客観的な指標としての肝脂肪化率の測定を, バーチャルスライドを用いて試みた.

II. 材料および方法

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あるいはNAFLと考えられた症例から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 μm 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染色標本を顕鏡し, 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²⁾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) 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 μm 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.

$$\text{脂肪化率} = \frac{\text{脂肪変性肝細胞領域総面積}}{\text{肝組織領域面積}}$$

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. 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

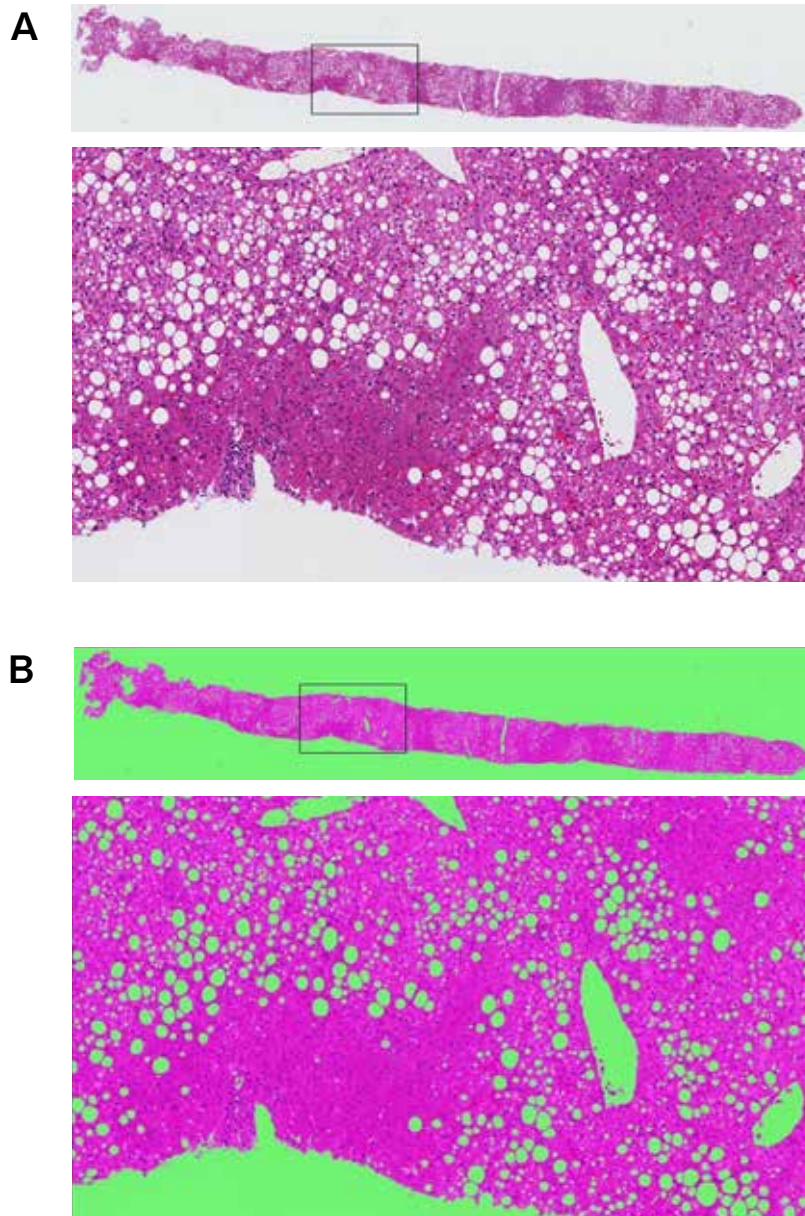


図1. 測定方法

- A. 原画像と一部拡大像. 針生検で採取した組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本. 明るい部分が脂肪変性に陥った肝細胞. 目視では脂肪化率60%と評価したが, 画像解析での計測値は16%であった.
- B. 脂肪変性領域を含む背景領域の抽出. Aの画像から三原色RGBのGの濃度により脂肪変性領域と組織のない背景領域を抽出し, 識別し得た領域を緑色で表している. 脂肪変性に陥った領域と門脈, 中心静脈と組織の存在しない背景領域が緑色に写しだされている.

しえた (図1A, B).

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 (図1B). 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

表 1. 脂肪変性肝細胞の最大面積, 最大径

No.	最大値 (μm^2)	最大径 (μm)
1	2,857	60
2	1,389	42
3	3,264	64
4	1,087	37
5	5,485	84
6	1,419	43
7	3,472	67
8	2,398	55
9	975	35
10	1,853	49
11	2,426	56
12	1,071	37
13	3,001	62
14	2,000	50
15	2,268	54
16	1,408	42
17	3,437	66
18	1,718	47
19	1,536	44
20	2,963	61
21	2,970	62
22	1,469	43

975 から 5,485 μm^2 の間に分布していた (表 1) 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 (図 1C). 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. 図に示すように脂肪変性と水腫変性を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 (図 2, 矢印). 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, その結果を表 2 に示す. 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. 代表的な例を図 1a, 3 に示す. 図 1a は目視では 60% と評価したが, 計測値は 16% であった. 図 3 は目視では 10% と評価したが, 計測値は 3% であった.

IV. 考 察

NAFL と NASH は各種非侵襲的検査で鑑別する試みが報告されているが, 現状では肝生検以外に有効な方法が見いだされていない⁷⁻¹¹⁾.

今回, バーチャルスライドを用いて, 画像解析により NAFLD 患者肝生検組織の脂肪化率の測定を試みた. その結果, 脂肪化率は最低で 1%, 最高で 34% であった. Brunt 分類^{12, 13)} では grade 1 は 33%, それ以上 66% までを grade 2, それ以上は grade 3 に分類しているが, 今回の画像解析による脂肪化率は 1 例を除き, 全て grade 1 に分類された. grade 2 に相当する症例はわずかに 1 例, それも値は 34% と grade 2 の下限の値であった. grade 3 に相当する症例はなかった. 今後, 多数例の解析を行う必要があるが, 現時点では Brunt らの grade 分類は再考の余地があると考え. 1999 年, Brunt らは 10 種類の炎症に関わる肝生検所見を評価し, 三つの指標, すなわち, 脂肪化, ballooning, 線維化の程度が有意な変化と結論し, それぞれの所見を 3 段階に分ける評価方法を提唱した¹²⁾. その後, 多くの研

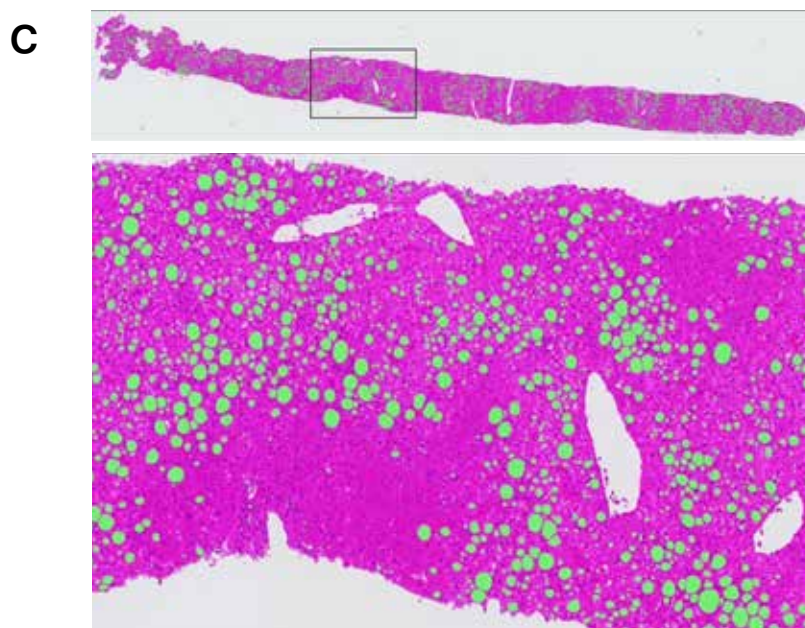


図1. 測定方法

- C. 脂肪変性領域の抽出. B の画像で緑色に表現されている領域から面積 $10\text{-}6,000 \mu\text{m}^2$, 形状係数が $0.5\text{-}1.0$ を示す領域を抽出することで脂肪変性領域のみを抽出できる. 組織の存在しない背景領域と大きな門脈, 中心静脈が除外されていることに注意.

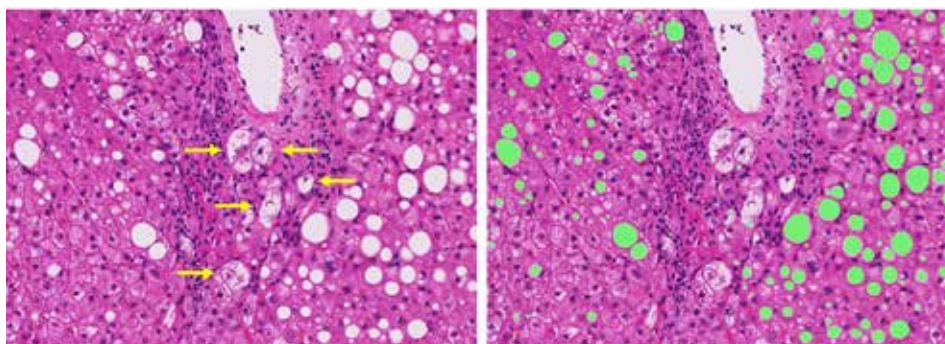


図2. 脂肪変性細胞と水腫変性の判別

脂肪変性細胞は抽出され, 水腫変性 (矢印) は抽出されない.

研究者がこの評価方法を採用し, 日本肝臓学会では2006年, NASH・NAFLDの診療ガイドブックでこの評価方法を推奨した¹⁴⁾. しかし, Franzenらは既に2005年には半定量的な目視による脂肪化率の評価は組織計測学的評価に比較して過大評価になることを警告している¹⁵⁾. Bruntらは2005年, 脂肪化, ballooning, 線維化の程度をそれぞれ3段階に評価し, その合計点をNASH/NAFLの炎症程度の指標として提案したが¹³⁾, Brunt自身もNASH/NAFLの多

施設共同研究を行った際に, 提唱したスコアリングシステムは診断にあまり寄与していないと結論し, 半定量的な目視による評価の課題としている¹⁶⁾. 日本肝臓学会は2015年, NASH・NAFLDの診療ガイドブックを改訂する際に, 目視による評価の指標として脂肪化の目安に各パーセントごとの組織写真を例示している²⁾. このガイドブックも指摘しているように, 脂肪化の分布は不均一なことが多く, 全体を俯瞰して評価することが重要であると思われる. 目視

表2. 画像解析ならびに目視による脂肪化率の計測結果

No.	画像解析			目視 (%)	目視と画像解析の差 (%)
	手動修正前 (%)	手動修正後 (%)	手動修正後の差 (%)		
1	17	16	0.1	60	44
2	4	4	0.1	30	26
3	28	28	0.1	80	52
4	5	5	0.0	30	25
5	34	34	0.0	70	36
6	12	12	0.1	40	28
7	15	15	0.1	40	25
8	11	10	0.3	20	10
9	5	4	0.3	30	26
10	5	5	0.2	30	25
11	11	11	0.2	50	39
12	2	2	0.1	10	8
13	17	16	0.1	50	34
14	19	19	0.2	50	31
15	10	10	0.1	40	30
16	3	3	0.3	10	7
17	2	2	0.2	5	3
18	1	1	0.1	10	9
19	9	9	0.2	30	21
20	14	14	0.1	30	16
21	13	13	0.1	20	7
22	7	7	0.1	20	13
中央値	10	10			25

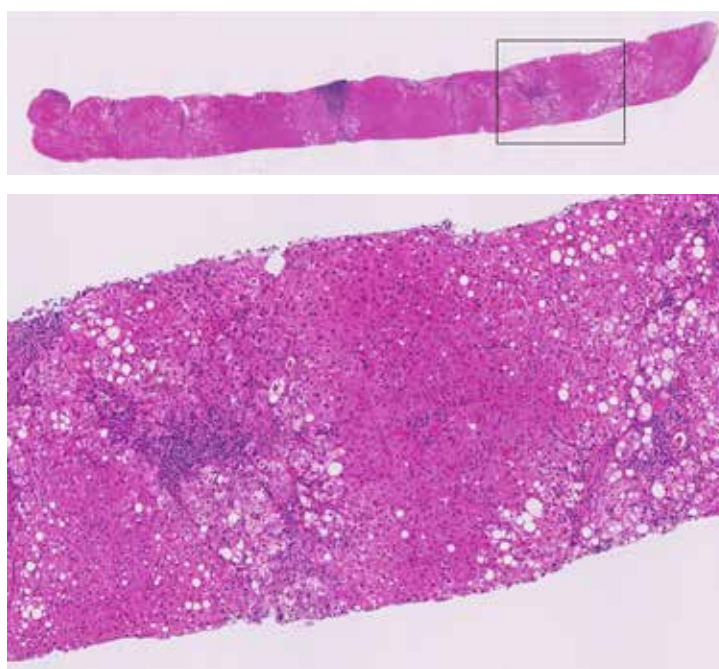


図3. 計測結果 No. 16 (表2) の全体像と一部拡大像. 目視では脂肪化率 10% と評価したが, 画像解析での計測値は 3% であった.

に拠る計測は主観が入りやすくなり、実際の値より大きめに計測される傾向にある。Franzenら¹⁵⁾はポイントカウンティング法¹⁷⁾により、目視に拠る計測の過大評価を指摘している。以前から用いられているポイントカウンティング法は、細かいマスを組織写真上に重ねて、マスの交差点にある組織を、脂肪変性を示しているかいないかを判定し、脂肪化率を測定するもので、この原理は今回の研究で使用した画像解析法と同様である。今回の我々の結果でも同様に目視による評価は過大評価されていることを確認することができた。今後、多数例の比較、多施設共同研究等において研究を行う場合には主観的要素が入らない、しかも簡便に再現性のある方法論で比較を行うことが肝要と考える。現在、多くの施設にバーチャルスライド装置が導入されている現状を考えると、早急な測定プロトコルの整備、ルーチン化を図る必要があると思われた。

肝生検の組織学的観察では脂肪変性と水腫変性とを区別して表現している。本来水腫変

性は急性肝炎時に融解壊死と共に組織の変性過程と考えられてきた。Matteoniら³⁾は脂肪変性の存在するtype 1、それに炎症像が加わるtype 2まではNAFLに分類し、比較的前後の良い病態と考えた。一方、水腫変性を示す一群をtype 3、更にpericellular fibrosis, central sclerosisに代表される線維化が生じるものをtype 4と分類し、後者の2つのtypeは病態が急速に進行するとして警鐘を鳴らしている。今回の計測では脂肪変性領域のみを計測できるように設計したが、将来的には水腫変性領域も個別に計測できるようになると、多施設間での比較研究が可能になり、NASHの病態解明に寄与できるようになると考える。

バーチャルスライド作成、データ集計で尽力された秘書、松本千鶴、藤原かすみ、菊池亜弥の三氏に深謝します。

利益相反：著者らには開示すべき利益相反はない。

References

- 1) 橋本悦子, 谷合真紀子: NASFLD/NASHの疾患概念の変遷: 問われるNASH診断の意義. 肝臓 **59**, 83-91, 2018.
- 2) 日本肝臓学会編: NASH・NAFLDの診療ガイド2015, 文光堂, 東京, 2015.
- 3) **Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al.**: Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterol* **116**, 1413-1419, 1999.
- 4) **Sawai T**: Telepathology in Japan. Telepathology, ed by Kumar S and Dunn BE, pp.105-125, Springer Verlag, New York, 2009.
- 5) 東福寺幾夫, 澤井 高志: バーチャルスライドの利用と標準化に関する調査報告 日遠隔医療会誌 **8**, 19-24, 2012.
- 6) 小林直樹, 坂元亨宇, 橋口明典, 他: 病理画像における画像処理技術の役割: 定量的病理診断に向けての取り組み. 映像情報メディア学会技術報告 **36**, 17-22, 2012.
- 7) **Verhaegh P, Bavalia R, Winkens B, et al.**: Noninvasive tests do not accurately differentiate nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis: a systemic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**, 837-861, 2018.
- 8) 高木慎太郎, 川上由育, 阿座上隆広, 他: ARFI (acoustic radiation force impulse): 新しい非侵襲的方法による肝線維化の評価. 肝臓 **50**, 467-469, 2009.
- 9) 飯島尋子: 慢性肝疾患の画像診断の進歩—超音波検査は組織診断に代わりうるか. 日消病会誌 **108**, 908-915, 2011.
- 10) 直江秀昭, 田中基彦, 佐々木裕: 門脈圧亢進症の診断. 日消病会誌 **116**, 374-385, 2019.
- 11) **Mathiesen LE, Franzen H, Åselius M, et al.**: Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases. *Digest Liv Dis* **34**, 526-522, 2002.
- 12) **Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al.**: Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J*

- Gastroenterol **94**, 2467-2474, 1999.
- 13) **Kleiner DE, Brunt, EM, Van Natta M, et al.:** Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313-1321, 2005.
 - 14) 日本肝臓学会編: NASH・NAFLDの診療ガイド, 文光堂, 東京, 2006.
 - 15) **Franzen LE, Ekstedt M, Kechagias S, et al.:** Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Modern Pathol* **18**, 912-916, 2005.
 - 16) **Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, et al.:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**, 810-820, 2011.

Quantitative measurement of steatosis in liver biopsy specimens using virtual microscopy

Junzo KAWAGUCHI and Tomoyuki MASUDA

Department of Pathology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on January 9, 2020 & Accepted on February 12, 2020)

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is evaluated by liver biopsy. Degree of steatosis is assessed along with inflammation and fibrosis, although steatosis is usually assessed by a morphological semiquantitative method. For accurate evaluation and assessment in multi-institutional studies, an objective method is

preferable. We attempted accurate evaluation of steatosis using virtual microscopy. Using variable parameters such as area, shape and separation indices, successful measurement was achieved. The results indicate that the morphological method overestimates the degree of fatty degeneration when compared with virtual microscopy.
