

## 肝疾患における形態変化の解析

### Morphological changes in a hepatic lobule of fatty livers

昌子浩登<sup>1</sup>, 山田耕太郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 京都府立医科大学医学部物理学教室,

<sup>2</sup> 阿南工業高等専門学校創造技術工学科

Hiroto Shoji<sup>1</sup>, Kohtaro Yamada<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Physics, Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 606-0823 JAPAN*

<sup>2</sup> *Liberal Arts Division, Anan National College of Technology, Tokushima 774-0017 JAPAN*

## 1 はじめに

肝臓マイクロ構造をみると、図 1 (a)の概念図で示すように、各肝細胞に、血管系である肝類洞と、肝細胞で排出される老廃物を外に排出するための管である毛細胆管の 2 種類の管と接している。もちろんそれぞれの管は交わることがなく構成されており、これらは 2 次元像では精密には表すことのできない 3 次元的な構造である。実際、共焦点顕微鏡を用いてマイクロ構造を観察してみると、図 1 (b)のように 3 次元空間特異的な周期ネットワーク構造が織り成されていることがわかる。この形態の構造制約条件は、疾患などによる形態変化でも変わることなく保持される[1]。そのため、形態変化に少なくともある影響は与えると想像される。

これまで病理切片解析においては、病理サンプルの(4~15  $\mu$  mの厚さの)超薄切り切片を作成し、ヘマトキシ・エオジン(HE)染色などの染色法が用いられた切片の 2 次元細胞像により病理判定が行われてきている[1]。前述のとおり、3 次元特有の構造を持つ肝臓マイクロ構造には、2 次元像による判定ではとらえきれない性質があるのではないかと筆者らは考え、現在我々は 3 次元形態の性質の解析を行っている。

また一方で、生体のような非平衡系での 3 次元周期構造変化について、その数理的、物理的な解析[2]はいまだ十分ではない。そのような中、3 次元周期構造示す典型例としての肝臓マイクロ構造の形態変化を物理的な指標として取り出すことは、病理解析的にも、数理解析的にも必要な課題であると考え[3]。本研究では、肝臓マイクロ構造の共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察像を用いて、疾患の判定指標の作成を行うことを目的とする。

三池ら[4]による 2 次元画像解析において反応拡散系(RD)を用いたノイズ除去ならびにエッジ検出の数理的な手法を応用して、肝臓マイクロ観察像の 3 次元画像データに RD モデルを用いた画像抽出を行う。この過程で、画像抽出するための最適なパラメータを探索することを通して、肝臓の疾患進行度合いの指標を作成することを目的とする。

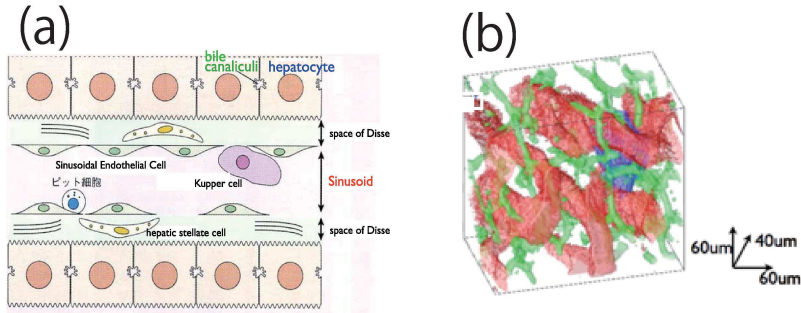


図 1：肝小葉内マイクロデータ図。(a)：マイクロ配置の構造概念図。各肝細胞には必ず類洞ならびに毛細胆管が接する構造になっているため、このような 2 次元概念図では表すことができない構造になっている、3 次元構造解析が必要になる。(b)免疫染色切片の CLSM による観察像の 3 次元再構成像。太い管は類洞構造を表す。細い管は毛細胆管を示す。

## 2. 方法

### 2.1 動物

業者(清水実験材料)から購入した 6 週齢雄の Wistar ラットを、ランダムに 3 匹ずつ、下の 6 グループに分けた。参考文献[5]のプロトコルに従って、深刻な繊維化をともなう非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) につながる病理兆候を示すことが知られる高脂肪高コレステロール飼料 (High-fat/high cholesterol, (HFC) 食 ((株) フナバシファーム) ) を 3 週, 6 週, 9 週連続投与する HFC3w, HFC6w, HFC9w 群, 並びにそのコントロール SP 飼料食 ((株) フナバシファーム) を 3 週, 6 週, 9 週連続投与する SP3w, SP6w, SP9w 群の 6 つを作成した。

### 2.2 観察

SP ならびに HFC 群のラットから肝臓を摘出し、 $40\mu\text{m}$  の厚みの凍結切片に、免疫染色を施し、共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000 confocal microscope, Fluo View ver. 2.00 software) で観察した。取得した画像は、平面的に 1 pixel が  $0.5\mu\text{m}$  に相当するよう指定し、そして深さ方向に  $0.5\mu\text{m}$  ずつ像を取得するように設定した。色調補正ならびに、画像補正を行い、各網分布の観察像に対して 3 次元立体再構築像を取得した。その 3 次元立体再構築像の例が、図 1(b) である。それぞれ、赤色は類洞を表し、緑色は毛細胆管を示す。図を見ると、太さの異なる 3 次元周期ネットワーク構造が互いに交わることなく、2 種の管が 3 次元空間上に張り巡らされていることがわかる。

### 2.3 指標化

三池ら[4]は、反応拡散系 (RD) モデルにより自発的にパターンが形成される機構を用いて、画素データ分布でみられるパターンのノイズ除去ならびにエッジ検出を行った。具体的

には、画像を表す各 2 次元格子点上での画素値 (0~255) で表される 2 次元画素値データ分布を、(0.0,1.0) に線形変換した分布を、RD モデル計算の初期状態をして与え、モデルの数値計算を行う。すると、画像分布のデータとしてノイズとみられる点の分布は自動的にまわりの分布になられ、また、界面に相当する領域では、値の変化をモデル方程式により自動的に再抽出することができ、エッジ検出という画像解析での主要な手法をオートノーマスに行う仕組みを開発してきた。我々は、共焦点顕微鏡により得られる画像の 3 次元ピクセルデータ分布を(-0.5, 0.5)に線形変換した空間分布を下のモデルの  $U(\vec{r})$  として与え、次の RD モデルを用いて処理を行う。

$$\partial u(\vec{r},t)/\partial t = D_u \delta \nabla^2 u(\vec{r},t) + u(\vec{r},t) - u^3(\vec{r},t) - v(\vec{r},t) + \varepsilon U(\vec{r}), \quad (1)$$

$$\partial v(\vec{r},t)/\partial t = D_v \delta \nabla^2 v(\vec{r},t) + \gamma \{u(\vec{r},t) - \alpha v(\vec{r},t) - \beta\}. \quad (2)$$

ここで、 $D_u, D_v, \alpha, \beta, \gamma, \varepsilon$  は定数パラメータを表す。 $u(\vec{r},t), v(\vec{r},t)$  はローカルな濃度を、そして、 $U(\vec{r})$  は画像ピクセルデータの分布を表す。 $\delta$  はスケールパラメータを示し、この  $\delta$  を調整することによって、ピクセルデータの分布にほぼ引き込まれた分布を自発的に形成される。

例えば、図 2 のように 1 次元分布の動態を考える。式 (1), (2) の反応項の平衡点に摂動を与えた分布を  $(u(\vec{r},0), v(\vec{r},0))$  に、そして画素分布から切り出して作った外場  $U(\vec{r})$  を与え、式 (1), (2) の数値計算を行い、 $t=10.0$  まで計算する。すると、 $u$  の最終分布をみると、 $U(\vec{r})$  の凸凹やノイズの取り払われた分布が自発的に形成される。

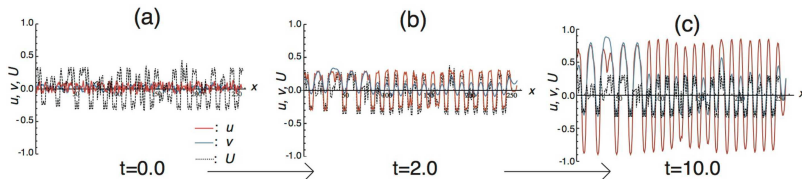


図2: 1次元パターンの実行例: 太線  $u$  の分布, 薄線  $v$  の分布, 点線ピクセルデータの分布。

この過程を3次元空間に拡張して、得られたCLSM3次元画像の特徴を抽出するパラメータ  $\delta$  を用いて探索する。具体的には、 $\delta$  を0.05ずつ変化させて、そのつど式 (1), (2) の数値計算を行い、パターンを作成する。そして、次の空間相関関数

$$I(\delta) = \frac{1}{V\sigma_u\sigma_v} \int \{u(\vec{r}) - \bar{u}\} \{U(\vec{r}) - \bar{U}\} d\vec{r} \quad (3)$$

の値を最大にする  $\delta$  を  $\delta^*$  としてパターン評価パラメータとした。ここで、 $\bar{u}, \bar{U}$  はそれぞれの分布の平均値、 $V$  は比較領域体積、 $\sigma_u, \sigma_v$  は  $u, v$  の分散をそれぞれ表す。

### 3. 結果: 空間スケール $\delta^*$ による疾患判定

類洞3次元パターンの例を図3(a)から(d)に示す。HFC食を長く食べ続けると、類洞網が変

形していくことがわかる。実際、肝細胞が脂肪滴をため込み、肝細胞自体が膨張し、パターンが変形することがパターンの変形の原因である[1]。  $\delta^*$  を比較すると図3(e)のように統計的な差が見られた。

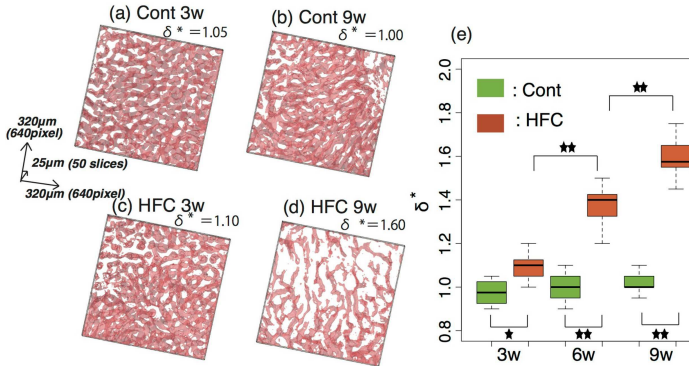


図3：(a)-(d) 得られたCLSM像の画像処理後の像。(e) スケーリングパラメータ  $\delta^*$  の比較。\*は  $p < 0.05$ , \*\*は  $p < 0.01$  を示す。

#### 4 まとめと議論

共焦点レーザー顕微鏡により得られる3次元像を用いて、類洞3次元パターンの脂肪肝進行度合い判定指標  $\delta^*$  を作成した。ここで作成した  $\delta^*$  は、生体パターンの周期の空間スケールを比較するのに適している。つまり、規則正しい周期構造の抽出パラメータとして、空間相関などの物理的な指標がすでに多方面で使われている。しかし、図3(a)-(d)のような生体のローカル性を含む周期構造では、空間相関などを用いて周期を計算するのには、曖昧性が多く含まれてしまう。そこで、その曖昧性も含めた抽出基準の作成として、RDモデルを用いたパラメータ抽出法を今回作成した。

そしてその応用例として、今回ヒトの脂肪肝によく似た症状を示すモデルラットを作成して、その肝類洞パターンの  $\delta^*$  を比較した。すると、図3(e)に示すように、コントロールと実験群に対して、並びに餌を与える時間の長さそれぞれの群に対して統計的な有意な差が得られた。

#### 参考文献

- [1] Sheila, J. Dooley, "Diseases of the Liver and Biliary System", Willey-Blackwell (2002).
- [2] H. Shoji, et al., *Phys. Rev. E* 75, 046727 (2007).
- [3] 昌子浩登, "肝小葉内の類洞と毛細胆管の形態形成数理モデル", 京都大学数理解析学研究集会考究録1937, pp112-119 (2015).
- [4] H. Miike et al. *J. Institute of Image Electronics Engineers of Japan*, 32, 378-385.
- [5] X. Jia et al., *Life Science* 90, 934-943 (2012).