

ホモロジーの概念を用いた組織画像解析方法について

A tissue image analysis method via the homology concept

中根 和昭 (Kazuaki Nakane)

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

The Graduate School of Medicine, Division of Health Sciences,
Osaka University

概要

近年のデバイスの発達により、いろいろなサイズ・種類の組織画像が撮影されるようになった。それらの分析はその部門の専門家によってなされており、専門家の技量により結果が左右されることもある。数理的原理に基づく客観的解析手法の開発が求められているが、組織画像は一般に極めて複雑であるため、現在までで有効な結果は得られていない。

ここではホモロジーの概念を用いた組織画像解析法を紹介する。この手法は生体組織だけでなく金属組織をはじめ、いろいろな組織画像に対しても有効であると考えられるが、今回は生体組織について、近年にまとめられた研究結果をレビューとして網羅的に記述する。

1、イントロダクション

組織画像といえば、明瞭で規則性があるようなものから、癌組織の様に一見して数学的な構造を持たない様に見えるものまで、いろいろな種類がある。現実に現れる組織のほとんどは後者のようなものであるが、このような組織画像の分析は、主にその部門の専門家によりなされている。この方法では、各々の専門家の技量により結果が左右される可能性が否定できない上に、大量の画像を処理することは難しい。大量処理を行うには、計算機の支援が必要不可欠であるが、現在まででは有効な解析アルゴリズムは見つかっていない。このため組織画像は、いわゆる「ビッグデータ」の一種であると考えられる。

ホモロジーとは位相幾何学の一分野であり、現在では高度に抽象化されており、数学的な課題として多くの場面で研究・応用がなされている。ここではホモロジーを「接触を定量評価する概念」という原点にもどり、それに基づいた組織画像解析法を提案する。

本稿では、これまでに解析を行ってきた生体組織への解析結果を紹介するが、2次元の場合（画像）のホモロジーは、非常に単純に理解されることはよく知られているため、この手法を他の組織画像解析に応用するのはさほどの困難は伴わない。今後いろいろな種類の組織画像に適用を期待したい。

2、病理画像に対する応用（『病理と臨床』2016年12月号）

2-1 病理診断とは

病理診断は癌の治療方針を決定する上で重要な情報を提供する。しかし、一部の先進国を除いて病理診断を担う病理医の数は十分とは言えない。特に日本の場合は、病理医不足は深刻で、実際に病理診断を行う病理医数は2,000人弱しかいない。今後、人口の高齢化とともに日本のがんの罹患者の数・死亡者の数は増加していくことが見込まれるが、このままでは病理医に負担が集中し、病理診断の質を維持できるかが危惧されている。また病理医は大都市部などの大病院に偏在する場合が多く、常勤病理医のいない地方の病院では、患者に対して必ずしも十分なサービスが出来ているとは言い難い[1, 2]。これらの現状から、ネットワークを活かした遠隔診断技術や計算機による病理診断支援システムの開発が望まれている。

これまで病理診断支援システムの開発は、ディープラーニングなどをはじめとする、パターン認識技術に基づくアルゴリズムで構成されてきた。病理組織は形態が非常に複雑であるため、全ての形態を網羅しようとすれば、ライブラリーが非常に巨大なものになる。このため、ライブラリーを作成するのに時間的・経済的コストがかかるうえ、これを参照するためには、強力なハードシステムが必要となる。結果としてシステム全体では非常に高価なものになってしまい、残念ながら実用に適したシステムは未だ開発されていない。

最近、ホモロジーの考え方を応用した画像診断法が提案された[3, 4]。ホモロジーとは図形の接触を定量化する数学的概念である（cf. [5, 6]）。Nakaneらは、癌病変部は組織構成要素間の接触の状況が他と異なることに注目して、ホモロジーに関連する量（ベッチ数）を計測することで、ROI（興味領域）をデジタル化された標本から抽出する技術を開発した（[7]）。この手法は情報を直接画像から読み取るため、ライブラリーを必要とせず、一般のコンピュータでも十分運用に耐えられる。これまでの研究では偽陽性が多いものの、偽陰性は少なく今後スクリーニングに用いられることが期待されている（Table 1 (a), (b)参照）。また、この方法をさらに深化させることにより、分化度の分類に対して有効な成果を得た[8]。本小論ではホモロジーの基礎概念から解説を行い、この手法による解析結果を紹介する。

2-2 病理現象との関連

大腸の場合、癌細胞は接触阻止性を喪失(loss of contact inhibition)しており、重なり合って増殖を続ける。これが癌組織の多様性を生む原因の一つとなっている。この現象をホモロジーの考え方を使って表現できないかを考える。

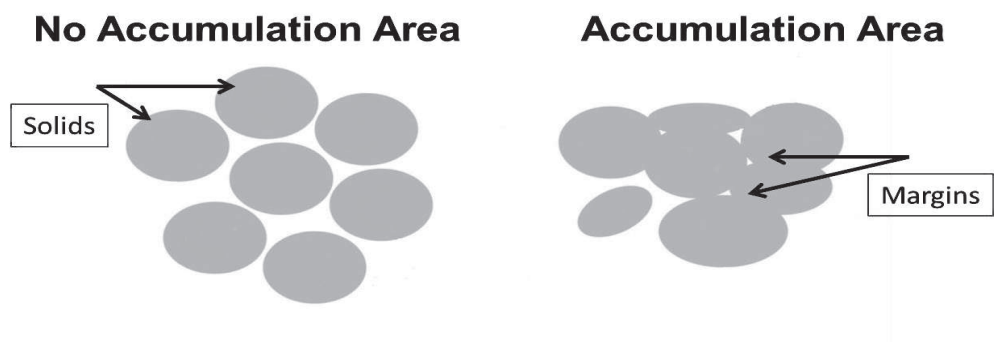
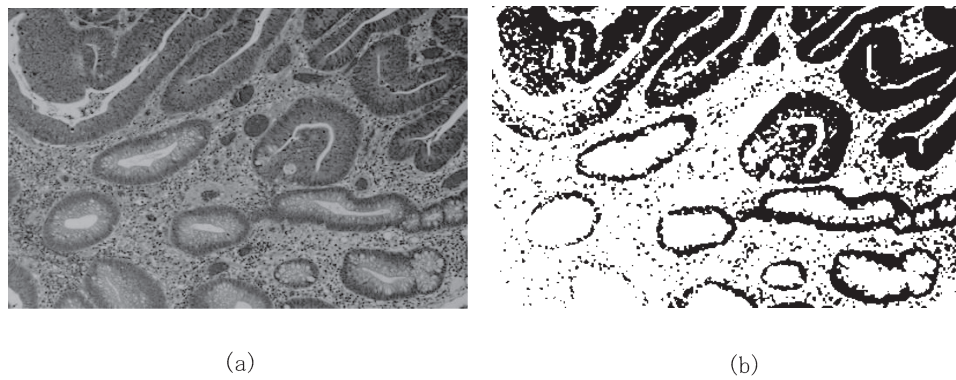


Fig. 1: 癌化による無秩序な増殖が始まると、組織構成要素間で接触が生じ互いに圧迫を始める。左の図は模式的にその様子を書いたものだが構成要素間に接触が生じると、囲まれた領域が生じるのが分かる。

Left:b0=7、b1=0、 Right:b0=2、b1=4

実際の画像に対して本手法を適用するには、画像を数学的な対象にかえる必要がある。そこで、適切なパラメータにより画像を二値化する（白と黒の図にする）。この二値化のパラメータは画像の RGB データから決定される。



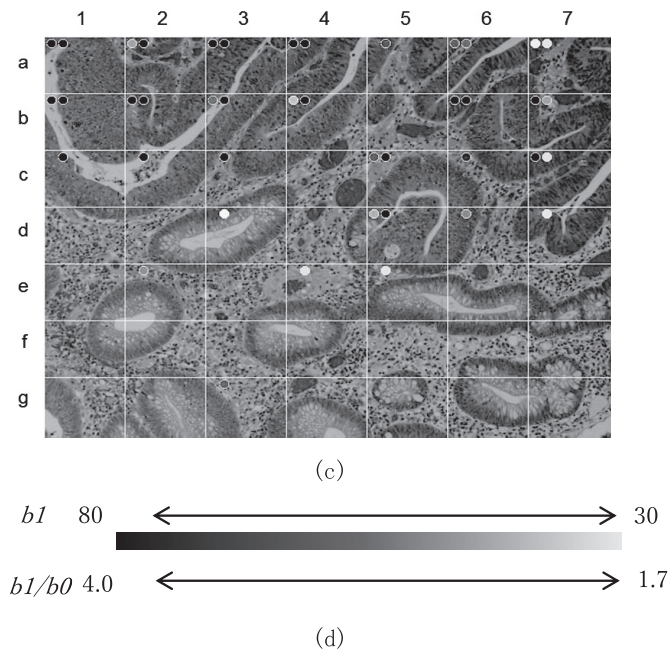


Fig. 2: (a) 実際の大腸組織の画像。上半分に腫瘍、下半分に異形成がみられる。(b)ある閾値により二値化（白黒）にした結果。(c)画像を分割してそれぞれの領域でベッチ数を計算した。分かり易いように指標の値によって色付けしたドットを左隅に配置した（左 $b1$ 右 $b1/b0$ 、指標の低い場合は無印）。病変部の上には何らかのドットが配置されていることが分かる。

Fig. 2 は、二値化画像を分割して、それぞれの領域で $b1$ 、 $b0$ を計算し、その値によって色のついたドットを配置したものである。 $b1/b0$ は一つの連結成分の中に幾つ穴があるかを示す指標であり、接触の密度を表している。この結果は病理医の診断とも一致している。

2-3 結論

この手法は言ってみれば病理医がサンプルを『透かしてみる』（白い背景にかざしてみる）方法と酷似している。つまり「穴」の部分はサンプルから漏れてくる「光」であり、それにより病理医は ROI がどこにあるか漠然ではあるが、判断している。この方法は他の腺癌に対しても適用できると考えられているが、印環細胞癌や非充実型低分化腺癌にはあまり有効とは言えない。また、実際の組織では、細胞密度が高まると 3 次元的に細胞が密集するため、標本にして平面的に見ると、実際に接触しているわけではないが、核が重なり合っているように見える。こうした核の重なり合いは、癌に限らず、非腫瘍性の過形成や、再生性変化などでも起こる。これらは疑陽性としてカウントされる（表 1 (b)）。

	ROI	Benign
ROI	1604	91
Benign	1	118
Sensitivity		99.9
Specificity		56.5
False positive		43.5
False negative		0.1

ROI		Non-ROI	
Mild atypia	156	Cross sections of inclined glands	73
Inflammation mucosa	99	Numerical artifact	16
Hyperplastic polyp	34	Specimen artifact	2
Inflammatory cells	16		
Regenerateice change	12		
Necrosis	6		
Lymphoid follicles	4		
Concentration of Lymphocyte	4		
	331		91
		total	422

(a) (b)

Table 1 (a) 処理結果の四分表。腫瘍・高分化・充実性低分化腺癌は問題なく抽出できる。しかし、非充実型低分化腺癌はこの方法では指摘できない。(b) 今回擬陽性とした部分を詳細に調べたもの。腺管を斜めに切った部分が擬陽性の大半であることが分かる。この部分の境界は安定した形態を持つので、曲率などを計算することで減らすことは可能と考えられる。

3、生体に関する組織画像解析 (『実験医学』2017年3月号)

3-1 膨潤現象とは

天然ゴムや木材などの高分子物質を有機溶媒や水中に浸したりする場合に、膨張することがよく見られる。これを膨潤現象 (swelling) と呼んでいる。この現象は高分子鎖の間に溶媒分子が入り込んでゲル状にふくれあがることによって生じる。これは化学反応とは異なるが、亀裂や溶解などの物質の耐久性などに大きな影響を与えるため、各方面で研究が進んでいる。

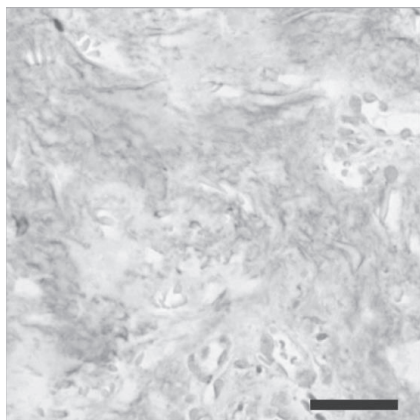
3-2 サルの臀部における膨潤現象

サルの中で、左右の鼻の穴が接近して下または前を向いている種を狭鼻猿類といい、主にアジア・アフリカなどの旧世界に分布している。アカゲザル・ニホンザル・テングザルなどがこの仲間である。これらのサルのうち、いくつかの種のメスでは臀部の性皮腫脹 (exaggerated swelling) が観察され、特にチンパンジーなどでは外見上も顕著に肥大するため進化生物学からの関心が高い[9, 10]。この性皮腫脹の多くは排卵周期にしたがって変動するため、妊性を示すと考えられている[10]。アカゲザルとニホンザルは近縁種ゆえ、ともに同様の腫脹を示すとされているが、経験的にはニホンザルの飼育個体群は腫脹を示しにくい。

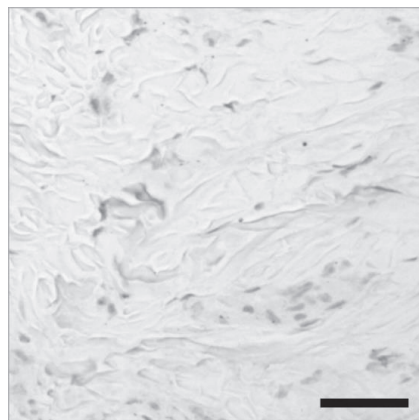
サルの臀部の腫脹は、繁殖期にヒアルロン酸が産生され、皮膚表面付近のコラーゲンを主とする線維で作られた媒質に膨潤した場合に起こる[11, 12]。これまで、ヒアルロン酸の膨潤による腫脹を定量的に評価するためには、2つの方法があった。ひとつは生化学的な手法を用いて精製したヒアルロン酸の重量を測定すること、もうひとつはヒアルロン酸を染色した組織切片について画像解析を行うことである。画像解析を行う場合は、ヒアルロン酸をコロイド鉄やアルシアンブルーで染色した画像から染色の色味を抽出し、ある閾値を定め、

それ以上の色味を持つピクセル数を計測することで行われる。この閾値設定については多く主観が含まれるため、客観性を持つ指標が必要とされている。

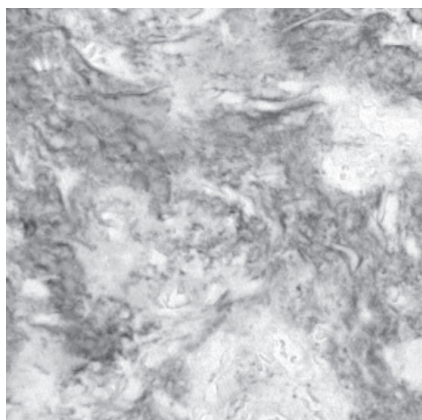
下の画像は実際のサルの臀部の組織の写真である Fig. 3(a)は繊維質の媒質の中にヒアルロン酸が膨潤した状態である。組織を染色して顕微鏡で見た場合、繊維質に沿って膨潤が進んでいくため、膨潤がすすむにつれて囲まれた領域が増加していくことが予想できる。



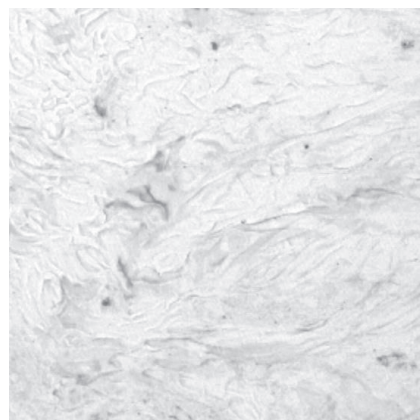
(a)



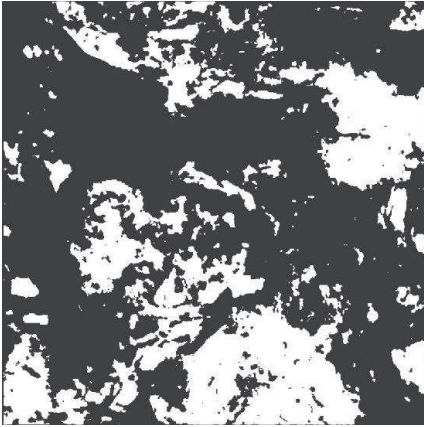
(b)



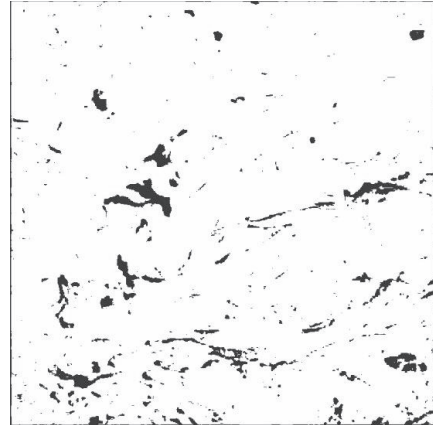
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 3 (a)はアカゲザル、(b)ニホンザルの臀部の切片をコロイド鉄染色したものである（後染色：細胞核をピンク色に染めるケルンエヒトロート液）。

水色に染色された領域がヒアルロン酸の局在を示している。Bar: 50 μm

(c) (d)はそれぞれ (a) (b) の青色の成分だけを抽出したもの。細胞核などの今回の計測に不必要なものが消えていることがわかる。

(e) (f) はしきい値 210 で (c) (d) を二値化した画像。膨潤した部分をよく表している。

3-3 実験方法

京都大学霊長類研究所で飼育されているアカゲザル 6 頭、ニホンザル 6 頭を用いた。これらのサルについて、以下のサンプリングを非繁殖期（2010 年 7 月、2011 年 8 月）と繁殖期（2010 年 10 月、2011 年 11 月）について行った。動物実験は京都大学の倫理規定に準拠して行われた。

繁殖期のアカゲザル臀部の組織切片を撮影した 1 枚の写真について、単位面積をさだめ分割（ 4×4 ）を行い、しきい値を 145-255 の範囲で二値化して、それぞれの領域で b0、b1 を計算した。その変化のグラフを観察した。

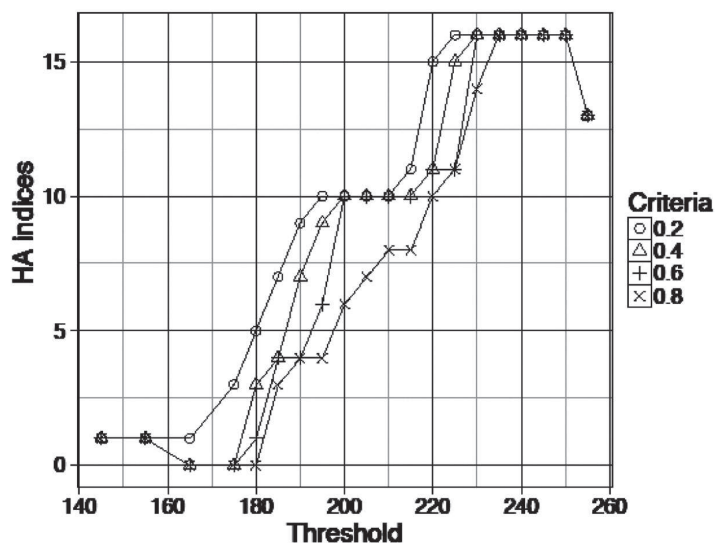


Fig. 4 ある領域の $b1/b0$ が基準値 (Criteria) 以上の場合にその領域がヒアルロン酸によって膨潤していると設定した。ただし $b0$ が 0 の場合は 0 と定めた。そして全領域中 (最大 16) のうち膨潤を示した領域の数を指標値 (HA index) とした。その結果、基準値が 0.4–0.6 の場合に、指標値の結果はしきい値 (Threshold) によらず変動を示さなかった。つまりこの範囲の基準値・しきい値を設定すれば結果はロバストであり、主観的な値決定に影響されないことを示している。

グラフを見ると基準値 (Criteria) が 0.4–0.6 の場合に指標値が変動を示さない領域 (しきい値 200–215) がある。この区間での二値化画像は膨潤の様子をよく表しているため、この値を基に統計的な解析を行った。

3–4 結論

腫脹の観察の結果、アカゲザル 6 頭で腫脹が観察され、ニホンザル 6 頭では腫脹が観察されなかった。それぞれのサルについてホモロジー量を用いて解析し、季節間で有意水準 5% の t 検定 (ペア) を行ったが、6 頭ずつの解析ではアカゲザルで指標値の顕著な増加が見られたがニホンザルでは変化は有意ではなかった。この結果は観察の結果と合致する。

アカゲザルとニホンザルは近縁種であり、腫脹などの繁殖様態も似ているとされる。しかし同一飼育環境下において組織学的には異なる様相を見せており、現在はこの種差を生じる要因について検討を進めている (論文準備中)。従来は主観的にしきい値を決定するしかなかった膨潤現象の組織学的評価において、ホモロジーを利用した本手法によりロバストな結果を導く客観的手法を提示したと言える。

4、おわりに

ここでは、ホモロジーの基本的な性質を用いて組織画像解析の方法を提案した。この手法はここで紹介した以外にも、CT像の解析[13]にも応用されている。特に機械学習の手法と同時に用いることで非常に高い精度の結果が得られることが期待できる[14]。

画像解析の方法は現在でもいろいろ提案されているが、現象の本質と乖離したアルゴリズムでは、たとえ現象が再現されたとしても、現象を理解するうえでは、有効な手段とはなり得ない。現象の本質が何であるかを把握して、それに基づいたアルゴリズムが提案されることが望ましい。

今回、ホモロジーが接触の程度を定量化するものととらえ、複雑な組織画像に対して応用した。組織はそもそも組織構成要素間の接触で構成されるため、いろいろな工夫を施せば、多くの組織化像解析に応用することが可能であると考えられる。

参考文献

1. 病理医の現状調査とバーチャルスライドによるコンサルテーションネットワークの構築 豊田 祐一、江田 英雄 日本プライマリ・ケア連合学会誌 Vol. 37 (2014) No. 3 p. 244-248.
2. 忘れられた医師不足～病理医不足 病理専門医、近畿大学医学部講師、全国医師連盟理事 榎木 英介 2015年7月13日 MRIC by [医療ガバナンス学会](#)
3. K. Nakane and Y. Tsuchihashi, A Simple Mathematical Model Utilizing a Topological Invariant for Automatic Detection of Tumor Areas in Digital Tissue Images, Diagnostic Pathology 2013, 8 (Suppl 1).
4. Homology-based method for detecting regions of interest in colonic digital images K. Nakane, A. Takiyama, S. Mori, N. Matuura Diagnostic Pathology 2015, 10:36 (24 April 2015)
5. T. Hibi, “Commutative Algebra and Combinatorial Logic”, Springer-Verlag, Tokyo, Inc, 1995.
6. T. Honma, “Combinatorial Topology”, Morikita Publishing Co., Ltd., 1972.
7. PCT/JP2010/000135
8. Classification of degree of differentiation of colorectal neoplasm by changes in the Betti number Kazuaki Nakane, Akihiro Takiyama, Nariaki Matsuura
9. Adolescent exaggeration in female catarrhine primates, Anderson CM, Bielert CF, Primates 35: 283-300, 1994.
10. The evolution of exaggerated sexual swellings in primates and the graded-signal hypothesis, Nunn CL, Animal Behavior. 58(2):229-246, 1999.
11. The biosynthesis of mucopolysaccharides and collagen by the sex skin of

- estrogen-treated monkeys, Bentley JP, Nakagawa H, Davies GH, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 244(1): 35-46, 1971.
12. Increased Hyaluronate and Collagen Biosynthesis and Fibroblast Estrogen Receptors in Macaque Sex Skin, Bentley JP, Brenner RM, Linstedt AD, et al., *Journal of Investigative Dermatology*, 87(5):668-673, 1986.
 13. COPD、非 COPD 患者における低濃度域の定量評価へのホモロジーの適応, 臨床放射線 2017 年 1 月号, 西尾瑞穂, 179-187.
 14. Persistent Homology for Fast Tumor Segmentation in Whole Slide Histology Images, T. Kaisera, K. Sirinukunwattanaa, K. Nakane, Y. Tsangc, D. Epstein, N. Rajpoot, Medical Image Understanding and Analysis Conference (MIUA) 2016.