

新規な病態計測法： 組織の伸展応答パターンにおける機械学習の活用[†]

田上 幸歩^{*1}・鷹取 慧^{*1}・水谷 健一^{*2}・剣持 貴弘^{*1}
鶴山 竜昭^{*3}・池川 雅哉^{*1}・吉川 研一^{*1, *3}

A Novel Method of Measuring Pathological Conditions: Using Machine Learning in Tissue Stretch Response Patterns

Yukiho Tagami^{*1}, Satoshi Takatori^{*1}, Ken-ichi Mizutani^{*2}, Takahiro Kenmotsu^{*1},
Tatsuaki Tsuruyama^{*3}, Masaya Ikegawa^{*1} and Kenichi Yoshikawa^{*1, *3}

Abstract Pathological diagnosis is an important diagnostic technique to determine a medical treatment policy. In the standard method, diagnosis of tissue slices has been investigated based on the visual inspection by microscope. However, it is difficult to evaluate a state of disease in a quantitative manner using the current methodology. Here, we propose a novel pathological diagnosis method focusing on the physical characteristics of tissue sections depending on the difference of disease state. We have found that the cracking pattern caused by applying tension to tissue sections depends on the pathological condition. By adapting such cracking pattern as a quantitative index for pathological diagnosis, it becomes possible to perform pathological diagnosis in a reliable and quantitative manner.

Key words Machine Learning, Pathology Diagnosis, Biopsy, Lymph, Medical Support

1. はじめに

病理診断とは、病的所見を病理学の知識や手法を用いて病変の有無や種類を診断する医療行為のことで、患者への適切な治療方針決定にかかわる重要な診断技術である。今日における標準的な手法では、病理医が光学顕微鏡を用いてミクロレベルで病態組織を観察し、細胞の異型性、脱分化、破壊性・湿潤性増生などの形態的特徴から診断を行っている¹⁾。診断を正しく行うためには、さまざまな腫瘍の個別的、特徴的な組織学的パターンや肉眼的所見といった多くの症例について経験を積むことが必要である。

しかし、現在の標準的な手法では、組織切片の顕微鏡観察において定量的な指標に基づいた診断を行うことは困難であり、病理医の経験によって診断が異なる可能性があるといった問題点があげられる²⁾。今日、

これらの問題を解決するため、病理診断において、定量的な形態的特徴に基づく研究が進んでいる診断の精度をより高くすることを目指して、近年では機械学習を応用した病理診断や診断支援の研究が盛んに行われている^{3~16)}。しかし、病態組織の形態の多様さや、染色のばらつきなどにより、まだ十分な成果を上げるに至っていない^{17~20)}。

そこで、本研究では、正常組織と病理組織の細胞接着力などの物理的特性の違いを利用した新規な病理診断手法と機械学習を組み合わせ、従来の機械学習のみでは到達できなかったレベルでの高い精度の病態診断法の開発を目的とする。本研究で提案する手法は、組織切片に張力を印加して生じたひび割れパターンを指標としており、既に肝臓組織では病態の識別に成功している^{21,22)}。本稿では、マウスリンパ組織切片に張力を印加してひび割れパターンを形成し、機械学習を行った研究を紹介する。

2. 実験方法

2.1 組織切片の作製

本研究では、病態モデルマウスにおいて、Normal

^{*1} 同志社大学
Doshisha University

^{*2} 神戸学院大学
Kobe Gakuin University

^{*3} 京都大学
Kyoto University

[†] 2022年2月14日受付・2022年8月1日再受付

Lymph (健常なリンパ節), Lymphoma (悪性リンパ腫) のリンパ組織を用いた。それぞれの組織にパラフィン包埋を施し、パラフィンブロックを作製した(京都大学医学部附属病院クリニカルバイオリソースセンターより組織提供)。パラフィン包埋したリンパ組織を大型回転式マイクロームERM-230L(エルマ販売株式会社)の土台に設置後、厚さ $10\mu\text{m}$ で薄切した。その後、組織切片を蒸留水に浸し、続いて 42°C の温水に1分間浸して切片のしわを伸ばした。次に、組織切片を透明で伸縮性のあるウレタンゲルシート(EXSEAL Corporation)に貼り付けた。ここで、本実験で使用するウレタンゲルシートの大きさは $40\text{mm} \times 22\text{mm}$ 、厚みは 1mm である。ウレタンゲルシートに組織切片を貼り付けた後、 42°C の低温インキュベーターIJ100W(ヤマト科学社)で12時間放置して完全に接着させた。そして、脱パラフィン操作し、病理診断で最も一般であるHE染色(ヘマトキシリン-エオシン染色)を行った。

また、従来の病理診断法と比較するために、従来の病理診断法と同様に組織切片をスライドガラスに接着させ、HE染色を行い、光学顕微鏡GLB-B1500MBITb(島津理化)を用いて、40倍の対物レンズにて観察画像を取得した。

2.2 伸展装置を利用した組織切片の張力印加

2.1で作製した、組織切片を接着させたウレタンゲルシートを、伸展装置に設置した。続いて、**図1**に示すようにウレタンゲルシートの両端に、シートの150%の長さになるまで張力を印加し、組織切片を伸展させた後、元の長さに戻した。その後、組織切片を光学顕微鏡で観察を行い、観察画像を取得した。

2.3 機械学習による病態の識別

ここでは、本手法の汎用性をより高めるため、教師あり機械学習を用いた観察画像の識別を行うことにした。教師データとして、光学顕微鏡で取得した観察画像をもとに学習を行った。学習を行う画像として、正常な組織切片と悪性な状態の組織切片の観察画像の2種類を、約100枚用意した。また、本研究ではAnaconda(Python)を用いてKerasライブラリ、TensorFlow-GPU

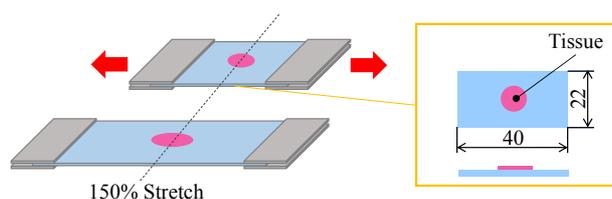


図1 伸展装置とウレタンゲルシートの張力印可の模式図

の環境構築を行い、用意した観察画像を用いてResNet50に対して転移学習をおこなった。ResNet50の活性化関数はsoftmaxを用いた。学習環境にはGPU(GTX 960 2GB)を用いて、epoch数は100で実行した。

3. 実験結果

図2にNormal LymphとLymphomaの組織切片の観察画像を示す。(1)は張力印加前のスライドガラス上での観察画像、(2)は組織切片をウレタンゲルシートに接着させた観察画像、(3)はウレタンゲルシートに接着させた組織切片に張力を印加した観察画像である。

図2(1)では、組織切片にひび割れは生じておらず、目視でNormal LymphとLymphomaの大きな差は確認できない。また、**図2**(2)(3)において、伸展前後の画像を比較すると、シートを伸展させることで、それぞれ顕著に特徴的なひび割れが発生した。特に、Normal Lymphでは比較的直線のひび割れが発生し、Lymphomaでは細胞に沿った、多方向に $10\sim 20\mu\text{m}$ 程度のひび割れが確認できた。

4. 機械学習による診断

図3は、学習したモデルを用いて、Lymphomaの顕微鏡画像を識別させたときの結果の一部である。伸展前の場合は、Normal Lymphと誤った識別をしているものもあるが、張力を印加してひび割れを発生させた場合は、ほとんど正しく識別された。そこで、**図4**に伸展前後のNormal LymphとLymphomaを25枚ずつ識別させたときの正答率を示す。まず、Normal Lymphに着目すると、伸展前に正しく識別されたのは60%であるが、伸展後は92%となり、正答率が上昇した。さらに、Lymphomaに着目すると、伸展前の正答率は0%だが、伸展後の正答率は88%となった。これらの結果から、伸展前に比べ、組織切片にひび割れを発生させた伸展後の方が、正答率は90%程度まで飛躍的に向上することが明らかになった。

5. ひび割れパターンについての考察

図2で示したように、Normal LymphとLymphomaの間に特徴的なひび割れパターンの差が生じた。そこで、Lymphomaの組織切片には、免疫細胞間の細胞接着分子の1つであるICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1)と、B細胞の活性化と増殖の調節に関与しているCD20の蛍光染色を行い、張力を印加してひび割れパターンを発生させた。その結果を**図5**に示す。

張力印可後のLymphomaのCD20を蛍光した**図5**(a)では、(a1)で示す直接的なひび割れの周りは発

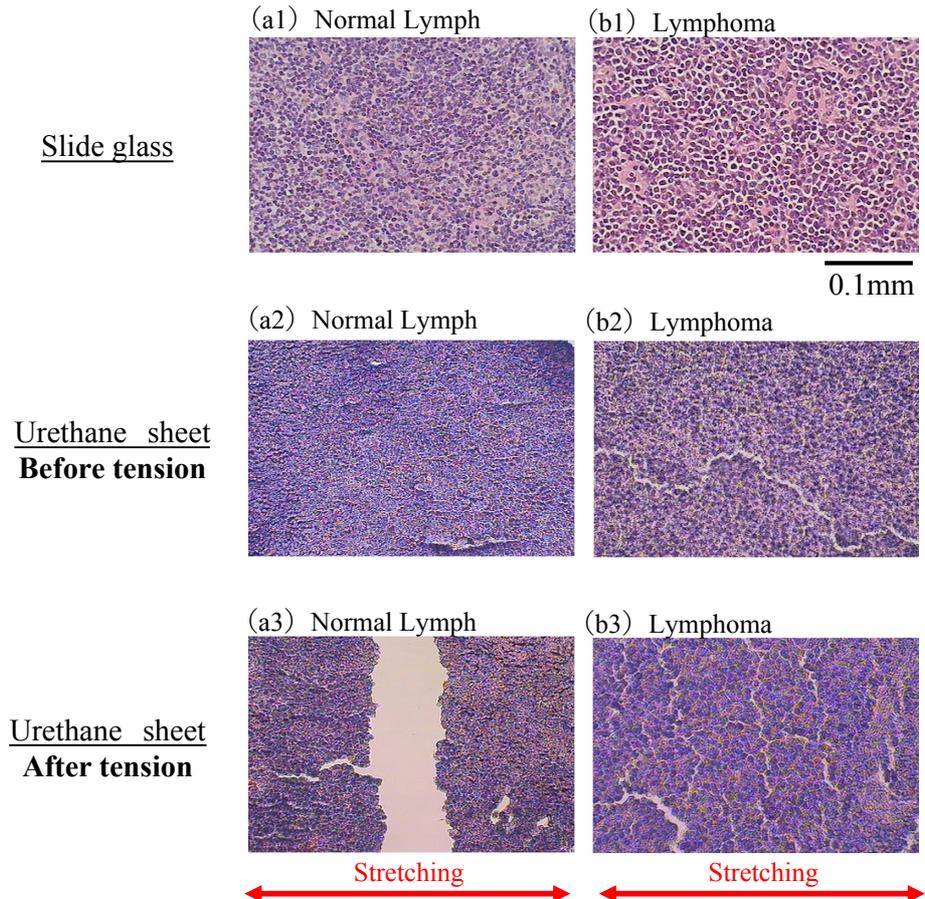
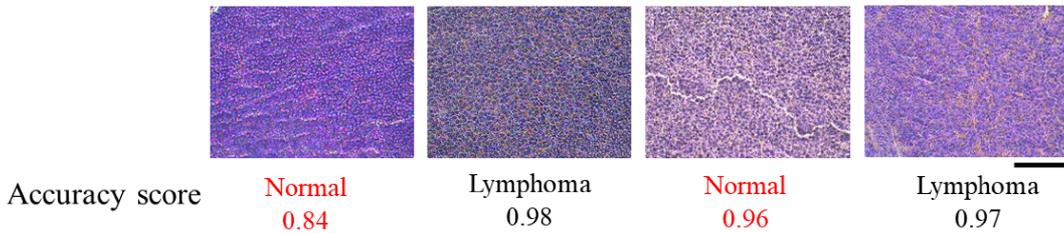


図2 リンパ組織の観察画像 (1) スライドガラス上, (2) 伸展前のウレタンゲルシート上, (3) 伸展後のウレタンゲルシート上

Before Stretching



After Stretching

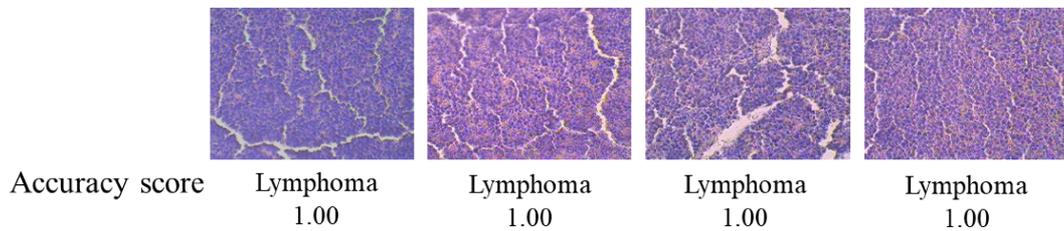


図3 機械学習による伸展前後の悪性リンパ腫識別 (スケールバー：0.1mm)

現が多く、(a2) で示す凹凸のあるひび割れの周りは発現が多いという傾向が見られた。また、ICAM-1を蛍光した図5 (b) では、(b1) で示す直接的なひび割れの周りは発現が多く、(b2) で示す凹凸のあるひ

び割れの周りは発現が少ないという傾向が得られた。これらのことから、直接的なひび割れの周りは細胞同士の接着力が強く、細胞同士の接着力が弱いという傾向があることが示された。

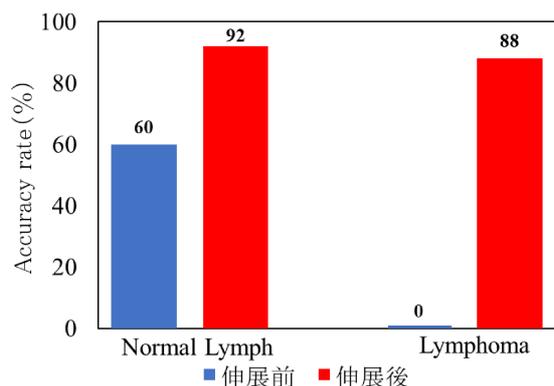


図4 機械学習による伸展前後のリンパ組織識別の正答率

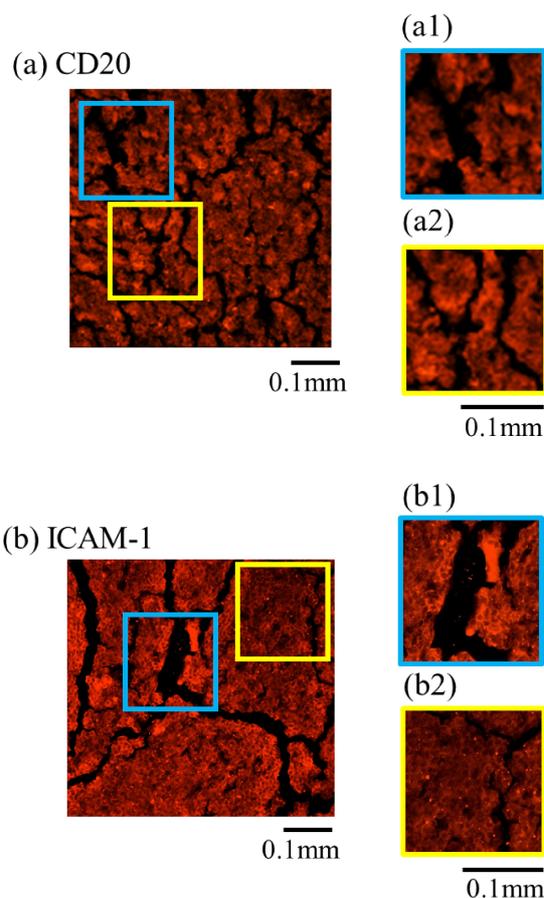


図5 悪性リンパ腫における蛍光観察結果 (a) CD-20, (b) ICAM-1

臓器の組織構築は、細胞の規則正しい配列により保持されている。この規則正しさは、組織構築の維持や臓器の機能に必須である。そこで、数多くのタンパク質が細胞外マトリックスである ECM (Extracellular matrix) を構成しており、ECM に細胞を埋没させ、細胞同士を結合させている。しかし、腫瘍化に伴って、これらのタンパク質に変化が生じ、組織構築消失の原因となる。さらに、組織構築を構成する膜タンパクのうち、カドヘリンはカテニンを介して細胞骨格と相互

作用し、細胞間接着としての役割を持つ。しかし、カドヘリンは、腫瘍化に伴って喪失するため、細胞同士の接着が低下する^{23~26)}。

このため、Normal Lymph は細胞間の接着力が強く、直線的なひび割れが発生したと考えられる。一方で、Lymphoma では、腫瘍化によって細胞間の接着力が弱くなっているため、細胞に沿った凹凸のあるひび割れが発生したと考えられる。

6. 結論

従来の病理診断では、顕微鏡観察による診断であるため、定量的な形態評価が難しいことが問題であった。そこで、本研究では、組織伸展と機械学習を併用することで、極めて高い精度の病態診断が可能であることが、マウスリンパ組織で示された。今後、ヒトの病態診断の新しい手法として、実際の臨床診断に展開していくことが期待される。

謝辞

本研究は、日本科学協会の笹川科学研究助成による助成を受けたものです。

参考文献

- 1) 飯島宗一, 影山圭三, 石川栄世, 島峰徹郎: 組織病理アトラス, 文光堂 (2007)
- 2) Y. Tsuji, S. Yamaguchi, T. Nakamura and M. Ikegawa: Mass Spectrometry Imaging (MSI) Delineates Thymus-Centric Metabolism In Vivo as an Effect of Systemic Administration of Dexamethasone, *Applied Sciences*, **11-12**, 11038/11052 (2021)
- 3) N. Tanaka, H. Ikeda, T. Ueno, S. Watanabe and Y. Imasato: Fundamental study of automatic cyto-screening for uterine cancer. III. New system of automated apparatus (CYBEST) utilizing the pattern recognition method, *Acta cytologica*, **21-1**, 85/89 (1977)
- 4) 中根和昭, 鈴木貴, 松浦成昭: 位相幾何学的手法に基づくアルゴリズムによる癌病変組織部抽出法の開発 (応用), *日本応用数理学会論文誌*, **22-3**, 97/108 (2012)
- 5) N. Tanaka, H. Ikeda, T. Ueno, A. Mukawa, S. Watanabe, K. Okamoto and S. Tsunekawa: Automated cytologic screening system (CYBEST model 4): an integrated image cytometry system, *Applied optics*, **26-16**, 3301/3307 (1987)
- 6) Y. Yajima, T. Hiratsuka, Y. Kakimoto, S. Ogawa, K. Shima, Y. Yamazaki, K. Yoshikawa, K. Tamaki and T. Tsuruyama: Region of Interest Analysis using Mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue, *Scientific Reports*, **8**, 1/10 (2018)
- 7) N. Halama: Machine learning for tissue diagnostics in oncology: brave new world, *British journal of cancer*, **121-6**, 431/433 (2019)
- 8) D. Komura and S. Ishikawa: Machine learning methods for histopathological image analysis, *Computational and structural biotechnology journal*, **16**, 34/42 (2018)

- 9) A. Serag, A. Ion-Margineanu, H. Qureshi, R. McMillan, M. J. Saint Martin, J. Diamond, P. F. O'Reilly and P. Hamilton: Translational AI and deep learning in diagnostic pathology, *Frontiers in medicine*, **6**-185, 1/15 (2019)
- 10) S. Foersch, M. Eckstein, D. C. Wagner, F. Gach, A. C. Woerl, J. Geiger, C. Glasner, S. Schelbert, S. Schulz, S. Porubsky, A. Kreft, A. Hartmann, A. Agaimy and W. Roth: Deep learning for diagnosis and survival prediction in soft tissue sarcoma, *Annals of Oncology*, **32**-9, 1178/1187 (2021)
- 11) A. Binder, M. Bockmayr, M. Hägele, S. Wienert, D. Heim, K. Hellweg, M. Ishii, A. Stenzinger, A. Hocke, C. Denkert, K. R. Müller and F. Klauschen: Morphological and molecular breast cancer profiling through explainable machine learning, *Nature Machine Intelligence*, **3**-4, 355/366 (2021)
- 12) S. Banerji and S. Mitra: Deep learning in histopathology: A review, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery*, **12**-1, 1/13 (2021)
- 13) B. Acs, M. Rantalainen and J. Hartman: Artificial intelligence as the next step towards precision pathology, *Journal of internal medicine*, **288**-1, 62/81 (2020)
- 14) D. J. Fassler, S. Abousamra, R. Gupta, C. Chen, M. Zhao, D. Paredes and J. Saltz: Deep learning-based image analysis methods for brightfield-acquired multiplex immunohistochemistry images, *Diagnostic pathology*, **15**-1, 1/11 (2020)
- 15) A. Rana, A. Lowe, M. Lithgow, K. Horback, T. Janovitz, A. D. Silva, H. Tsai, V. Shanmugam, A. Bayat and P. Shah: Use of deep learning to develop and analyze computational hematoxylin and eosin staining of prostate core biopsy images for tumor diagnosis, *JAMA network open*, **3**-5, 1/15 (2020)
- 16) S. C. K. Tekouabou, S. Hartini, Z. Rustam, H. Silkan and S. Agoujil: Improvement in automated diagnosis of soft tissues tumors using machine learning, *Big Data Mining and Analytics*, **4**-1, 33/46 (2021)
- 17) B. Houssam, H. Hachimi and A. Amine: Deep convolutional neural network with tensorflow and keras to classify skin cancer images, *Scalable Computing: Practice and Experience*, **21**-3, 379/390 (2020)
- 18) H. Miyoshi, K. Sato, Y. Kabeya, S. Yonezawa, H. Nakano, Y. Takeuchi, I. Ozawa, S. Higo, E. Yanagida, K. Yamada, K. Kohno, T. Furuta, H. Muta, M. Takeuchi, Y. Sasaki, T. Yoshimura, K. Matsuda, R. Muto, M. Moritsubo, K. Inoue, T. Suzuki, H. Sekinaga and K. Ohshima: Deep learning shows the capability of high-level computer-aided diagnosis in malignant lymphoma, *Laboratory Investigation*, **100**, 1300/1310 (2020)
- 19) J. Carreras, S. Hiraiwa, Y. Y. Kikuti, M. Miyaoka, S. Tomita, H. Ikoma, A. Ito, Y. Kondo, G. Roncador, F. J. Garcia, K. Ando, R. Hamoudi and N. Nakamura: Artificial Neural Networks Predicted the Overall Survival and Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Pancancer Immune-Oncology Panel, *Cancers*, **13**-24, 6384/6416 (2021)
- 20) Z. Swiderska-Chadaj, K. M. Hebeda, M. van den Brand and G. Litjens: Artificial intelligence to detect MYC translocation in slides of diffuse large B-cell lymphoma, *Virchows Archiv*, **479**, 617/621 (2021)
- 21) K. Danno, T. Nakamura, N. Okoso, N. Nakamura, K. Iguchi, Y. Iwadate, T. Kenmotsu, M. Ikegawa, S. Uemoto and K. Yoshikawa: Cracking pattern of tissue slices induced by external extension provides useful diagnostic information, *Scientific reports*, **8**-1, 1/6 (2018)
- 22) N. Okoso, T. Kenmotsu and K. Yoshikawa: 組織切片の張力伸展応答：がんの病理診断手法の創出, *BIO ENGINEERING*, **36**-3, 60/67 (2019)
- 23) H. Urushihara, M. Takeichi, A. Hakura and T. S. Okada: Different Cation Requirements for Aggregation of BHK Cells and their Transformed Derivatives, *Journal of Cell Science*, **22**-3, 685/695 (1976)
- 24) T. C. Wright, T. E. Ukena, R. Campbell and M. J. Karnovsky: Rates of Aggregation, Loss of Anchorage Dependence, and Tumorigenicity of Cultured Cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**-1, 258/262 (1977)
- 25) R. Salazar, S. McPhee and G. Hammer: Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine 7th edition, LANGE (2019)
- 26) M. Takeichi: Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis, *Current Opinion Cell Biology*, **5**-5, 806/811 (1993)

著者紹介

田上 幸歩

2022年同志社大学大学院生命医科学研究科医工学医情報学専攻医工学コース 修了予定 2021年JSST2021にて Student Poster Presentation Award を受賞

鷹取 慧

博士(工学)

2018年同志社大学大学院生命医科学研究科医工学医情報学専攻医情報コース修了
専門：機械工学

水谷 健一

博士(人間環境学) 2002年京都大学大学院人間環境学研究科博士後期課程修了
専門：血管組織学

剣持 貴弘 (正会員)

博士(理学) 1999年総合研究大学院大学数物科学研究科核融合科学専攻修了
専門：生命物理

鶴山 竜昭

博士(医学) 2002年京都大学医学部大学院医学研究科病理学専攻修了
専門：病理学

池川 雅哉

博士(医学) 1998年京都大学医学部大学院医学研究科環境医学専攻修了
専門：ゲノム医学

吉川 研一

博士(工学) 1976年京都大学大学院工学医学研究科博士課程修了
専門：生命物理学, 非線形科学