

E. 結論

リウマチ膠原病疾患を学ぶ医学生・研修医向けの教育用ツールを作成し、ホームページ上に公開した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

バーチャルスライド(VS)を利用した診断スペクトルの構築
病理診断の精度向上を目指して

研究分担者 古谷 敬三 愛媛県立中央病院検査部病理 検査部部长

研究要旨

VS 画像はいったん取得すると迅速に取出し、目的に応じて容易に加工できる素晴らしい特性を有している。これを利用して組織診断(PD)スペクトルの構築を試みた。慢性肝炎の病期診断、肝細胞癌の核異型度診断、大腸腫瘍の異型度・良悪性診断、乳癌治療方針決定に重要な Ki-67 index(腫瘍細胞増殖能の指標)の判定などを、組織像をもとに軽度から高度、細胞サイクルの進行順(G0G1SG2M)に配列して組織診断スペクトルとした。これらのツールにより何時、誰が組織像を見ても高い再現性で診断が可能となる。また病変組織像の変化を連続的にみることができるので、この研究成果は、「VS を利用した医師のための学習ツール」の有効性を高めると期待される。

A. 研究目的・背景

当院では慢性肝炎の病期診断のためエラストグラフィが導入され、その診断精度の検証に生検肝および切除肝での組織学的病期診断(F0-F4)との相関を検討している。また、院内の肝疾患症例検討会では臨床医から「切除肝症例の病理診断報告で肝硬変と記載されているが、術中での肝触診ではそれほど肝硬度は増していなかった」と病理診断との乖離が指摘されることがある。そこで生検および切除肝での慢性肝炎病期診断を見直すと病理医間の不一致が見受けられ、さらに、組織診断前誤差の要因として組織標本の作製方法によっても無視できないほどの診断不一致が存在することに気付いた。また、FDG-PET/CT など機能画像での定量診断に関連して肝細胞癌の分化度診断に関しても精度向上が求められている。

ホルモン受容体陽性乳がんの術後薬物療法決定のために重要となる Luminal A と Luminal B (HER2 陰性)サブタイプを免疫組織染色による Ki-67 labeling index (Ki-67 LI)の高低で分類することが2011年の St.Gallen 国際会議において推奨されて、Ki-67 LI を正確に評価することが実地臨床から求められている。この Ki-67 の評価に関し、検体の取り扱い(ホルマリン固定条件など)、免疫組織染色法、評価法の標準化とそのカットオフ値の妥当性についての検討が必要である。

以上の背景から診断精度向上のため生検および切除肝組織、大腸腫瘍組織、乳がん組織を対象にバーチャルスライド(VS)画像を基に診断スペクトルの作製を試みた。

B. 研究方法

VS を利用した診断スペクトルの定義:そもそも病変の形態学的分類は複数症例のある形態所見を相対的に位置づける行為であり、幾つかのカテゴリーに分けられる。その結果、本来連続的変化を呈する形態所見を人為的に分類し、客観性・再現性に問題が生ずる。一方、診断スペクトルでは対象とするすべての症例のある形態所見に注目して、軽度から高度へと配列し、各症例の相対的な位置づけに重みを置くやり方である。従来の定量診断との違いは視覚依存的であるが病変の複雑など全体像を含めての評価となる。

VS はオリンパス社製の VS-100 を使用し、組織標本を対物 20 倍あるいは 40 倍でスキャンし VS 画像を作成した。

(1) 慢性肝炎および肝細胞癌核異型度の診断スペクトル

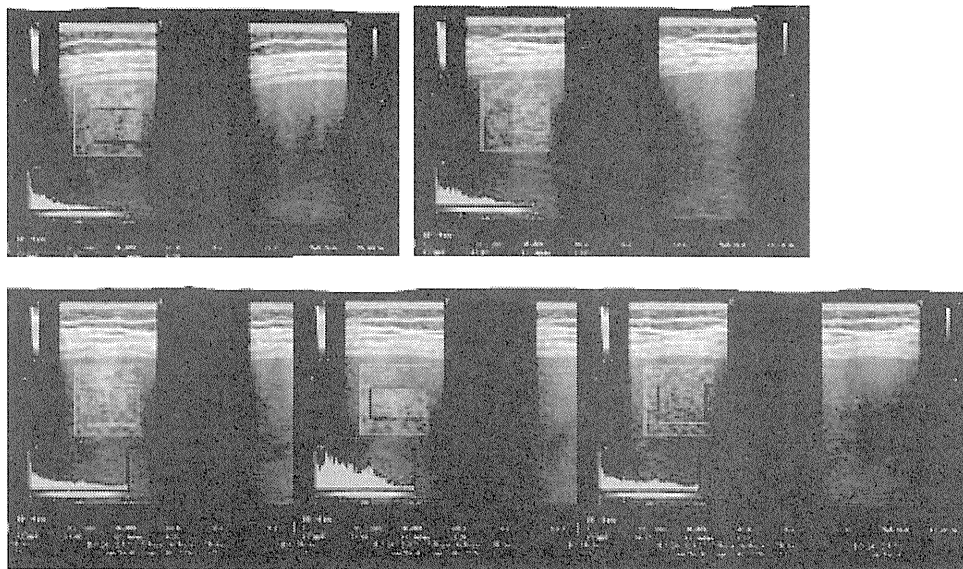
切除肝 50 例、生検肝 50 例を対象に HE 標本および Azann-Mallory 染色標本をスキャンし VS を作成した。慢性肝炎に関しては、新犬山分類の F0, F1, F2, F3, F4 およびそれらの間の移行像を含めてパワーポインターに取り込み(倍率 0.4)、正常から肝硬変へと進行度順に配列した(慢性肝炎の診断スペクトル)。各画像のキーとなる画像所見は高倍率の画像を並置して示した。

肝細胞癌では種々の核異型度(I, II, III, IV)の組織像(倍率 20 倍)をパワーポインターに取り込み、正常から核異型度の進行度順に配列した(核異型度の診断スペクトル)。

肝エラストグラフィと組織像の得られた 13 例に関してはそれらの相関を検討し、エラストグラ

フィーのデータ（肝線維化）と肝生検での慢性肝炎病期の相関を検討した。

%Area	65.94	53.44	48.3	37.7	41.28
LFindex	4.29	3.92	4.24	3.05	3.77



- (2) 大腸腫瘍の診断スペクトル:大腸腫瘍は内視鏡的切除腫瘍症例 8 例を対象に異型度順に腺腫、腺癌を並べて示した。倍率は 10 倍と 20 倍の両画像を使用した。
- (3) 乳癌組織の Ki-67 免疫染色の診断スペクトル:対物 40 倍 scan の画像を 100 倍に拡大して同一画面に表示した。G0・G1 から G2 の流れで画像を配列した。

今回は例えば病期 F2 から F3 の間と思われる症例は横軸の F2 と F3 の中間部にプロットした。

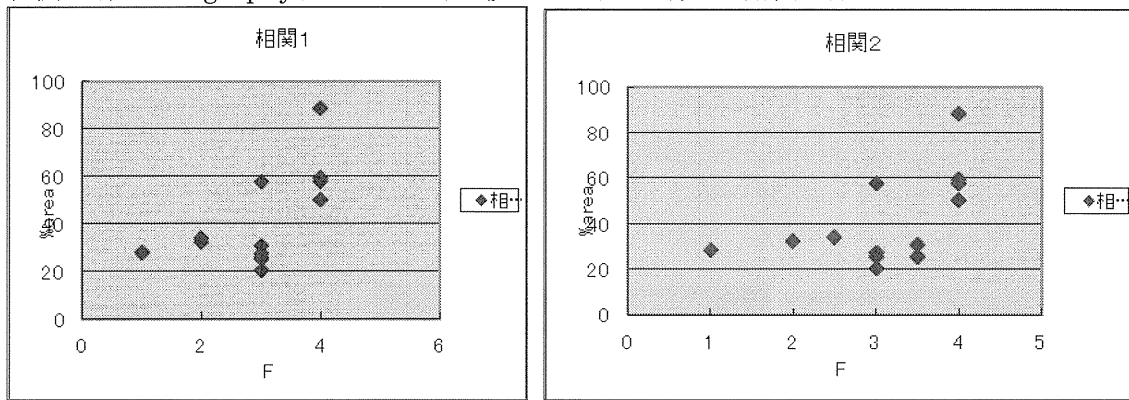
倫理面への配慮として、エラストグラフィの画像や対象とする組織の表示には患者を特定できないようにした。VS 画像取得の過程でもルーチンの病理診断番号とは異なる VS 検体番号に置換して記録した。

C. 研究結果

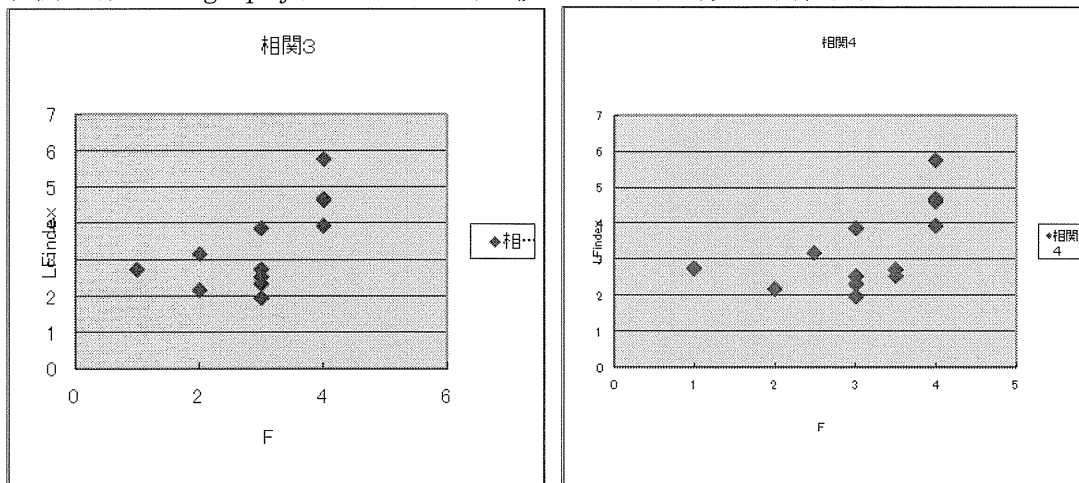
(1)慢性肝炎の診断スペクトルにより慢性肝炎早期から肝硬変まで連続的に変化し F4(肝硬変)であっても幅があり、進展過程を視覚的に容易にみることができた。肝細胞癌核異型度の診断スペクトルでも軽度から高度核異型への変化、進展を定量的にみることができた。

肝エラストグラフィと慢性肝炎の組織学的病期の相関は、%area での相関係数 $r = 0.614$ ($p = 0.025$)、LF index では $r = 0.639$ ($p = 0.018$)であった。

相関：肝 elastography(%Area)と肝生検による慢性肝炎の病期診断



相関：肝 elastography(LF index)と肝生検による慢性肝炎の病期診断



- (1) 大腸の腺腫と腺癌の異型度の進展度が視覚的に用意に把握可能となった。
- (2) 乳癌の Ki-67index：乳癌組織を対象に細胞周期 G0G1SG2M の流れを意識して Ki-67 PD spectrum を構築し、Ki-67 染色の強度を視覚的に把握できるようになった。どの範囲を陽性とするかを規定すれば、以前より客観的に Ki-67LI を計測できるようになった。PD spectrum 画像では 40 倍画像と 100 倍画像を同一画面に表示した結果、100 倍画像で核内の構造と染色性が詳細に観察できるようになった。

D. 考察

一症例でも部位により慢性肝炎の病期が異なることはまれではなく、また、肝硬変といっても臨床的な代償期／非代償期があるように組織像でも幅があるなど、単純な物差しでは診断精度に限界がある。今回提示した診断スペクトルを活用すれば、柔軟な対応が可能となる。肝エラストグラフィー関連の検索に関しては今後症例を積み重ねる必要がある。

肝エラストグラフィーや PET を含む機能画像などの臨床データはしばしば定量的・連続的な数値で

表現される。一方、慢性肝炎新犬山分類、腫瘍の核異型度など病理組織像では限られたカテゴリーで階段状に表現される。今回の診断スペクトルは視覚依存的ではあるが、従来よりも連続的・定量的に診断が可能となり、臨床データとの相関を見る際に有用と思われる。分子・遺伝子レベルの臨床データや機能画像所見などに基づく最新の研究、臨床試験においても、その臨床的意義の検証には臨床症状や病理形態学的所見などのデータが不可欠である。すなわち病理組織診断・所見は多くの研究において今後も gold standard として重要であり、従来よりも病理所見の正確で定量的な所見の読みが求められる。

Ki-67 は細胞増殖マーカーで、細胞周期のすべての相(G1SG2M)で発現しているが、G1 後期から発現量が変化し始め、S 期で発現量が増加し、M 期で最大(クロモソームの表面に Ki-67 抗原が存在)となる。図において Go, DNA 合成準備期(G1), DNA 合成期(S), 分裂準備期(G2), 分裂期(M)の比較的正確な時期の把握には Topoisomerase II α (S 期後期/G2/M 期に限定して発現)や Minichromosome maintenance protein (MCM) 7 (G1 初期/S 期に発現)の発現状態の情報が必要である。しかし、図のスペクトルで G1

から G2 への流れは把握可能である。Ki-67 index を求める際に、Ki-67 spectrum のどの画像から陽性とするか決めれば、診断者間や施設間の誤差が少なくなると思われる。

Ki-67 の免疫染色画像を画像解析装置にかけて迅速に Ki-67 LI を取得する自動診断ソフトがすでに開発されているが、増殖期腫瘍細胞核の他に血管なども染まるので、目視の方が腫瘍細胞を正確に選択して評価でき、より正確と思われる。

今後の課題として、1) 種々の臓器、病変の PD スペクトルの作製、2) PD スペクトルと分子・遺伝子変異、マクロ病理所見、治療方法の選択などとの相関を示唆する情報を対応させる。3) 連続変数とカテゴリ分類の相関を見る際に、後者のカテゴリ分類の間に重み付けをして相関をみると相関関係がどう変化するかなどがある。

E. 結論

VS を利用した digital pathology の環境では、種々の診断スペクトルの作製が容易であり、何時・誰が診断しても高度の再現性で定量的な診断が可能と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 菅 美樹、松田梨江、新島由紀、森 理恵、森いづみ、佐々木健二、古谷敬三、佐藤澄子、中村陽一：腎内動脈硬化の超音波診断が可能であった腎動脈狭窄症の一例。超音波検査技術 2011; 36(5):454-459
2. 大塚敏広、椿雅光、河崎秀樹、松田良一、喜安佳人、古谷敬三：胃小細胞癌 5 例の臨床病理学的検討。愛媛医学。2011; 30(3):169-174
3. 小林知子、山崎早織、松田梨江、新島由紀、林秀三子、鈴木美紀子、森いづみ、佐々木健二、古谷敬三、岡本憲省、奥田文吾：無菌性農園の経時的な脳波所見の予後に関する検討 愛媛県立病院学会誌 2011; 45(1):15-19

* 昨年 in print の状態であった論文

1. Muramori K, Taguchi S, Taguchi T, Kohashi K, Furuya K, Tokuda K, Ishii E: High Aromatase Activity and Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor in Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma in a Child Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 33(5):e195-e197, July 2011.
2. Furuya K, Kito K, Maeda T, Kikuchi T, Ishimaru Y, Nakamura S, Miyagawa M, Miki H, Hiraoka A, Michitaka K, Kawasaki H, Ochi H: Gross types of hepatocellular carcinoma reflecting their subnodular size are closely related with the effect of arterial embolization, tumor differentiation, glucose uptake, and vascular endothelial growth factor expression Virchow Arch 2011; 459(Suppl 1): S155

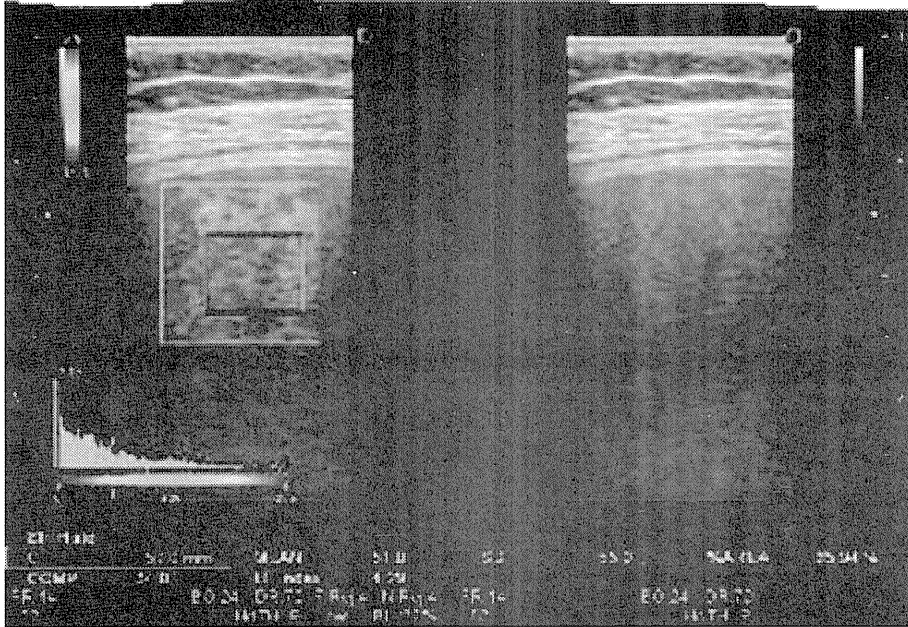
2. 学会発表

1. Furuya K, Kito K, Maeda T, Kikuchi T, Ishimaru Y, Nakamura S, Miyagawa M, Miki H, Hiraoka A, Michitaka K, Kawasaki H, Ochi H: Gross types of hepatocellular carcinoma reflecting their subnodular size are closely related with the effect of arterial embolization, tumor differentiation, glucose uptake, and vascular endothelial growth factor expression 23rd European Congress of Pathology, August 27-September 01, 2011/07/21, Helsinki Exhibition & Convention Center, Finland

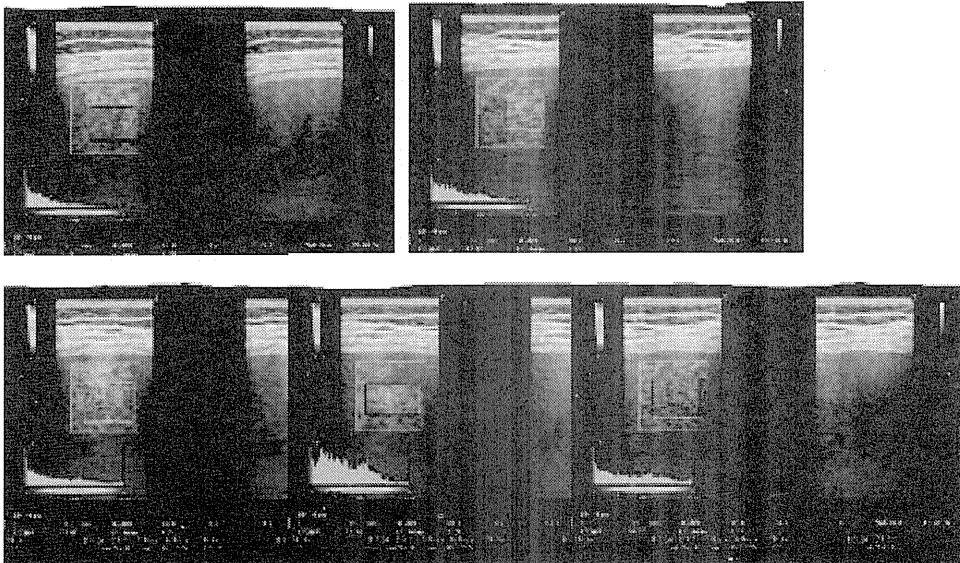
E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

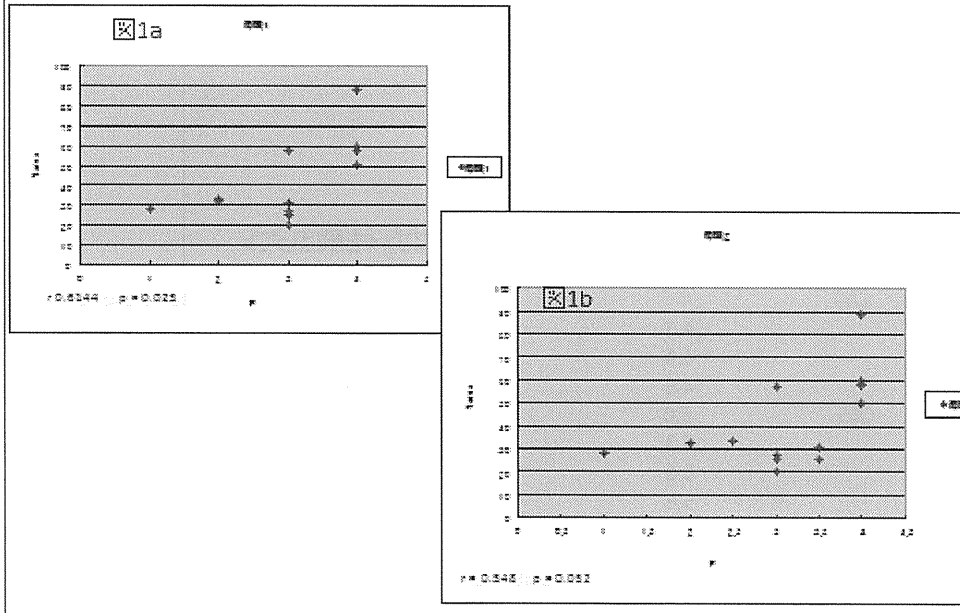
Elastography of Chronic hepatitis (HCV)
 %Area 65.94%, LF Index 4.29



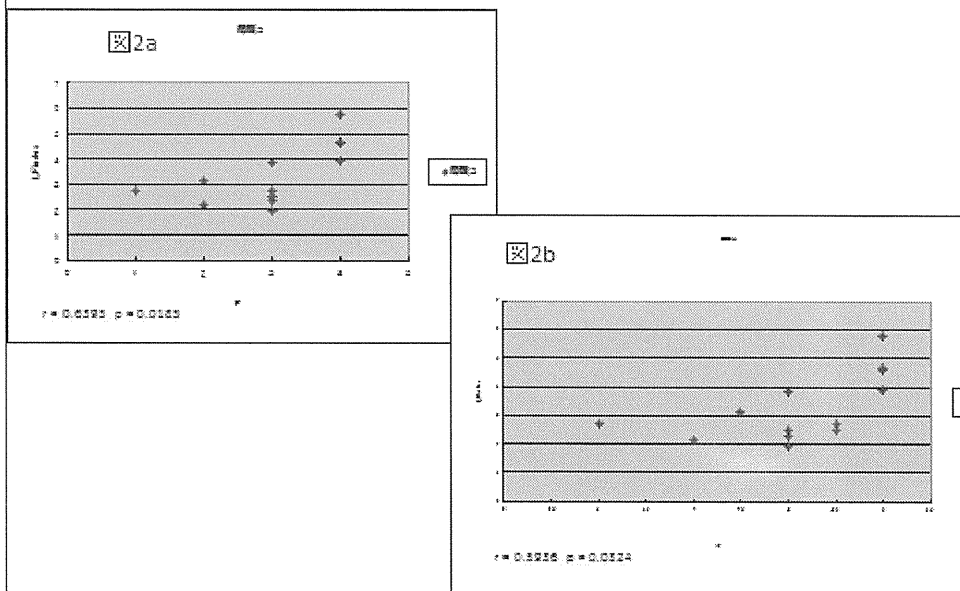
Elastography of Chronic hepatitis (HCV)
 %Area 65.94 53.44 48.3 37.7 41.28
 LF Index 4.29 3.92 4.24 3.05 3.77



相関: 肝elastography(%Area)と肝生検による慢性肝炎の病期診断



相関: 肝elastography(LF index)と肝生検による慢性肝炎の病期診断



診断スペクトル	カテゴリー	半定量化(重みづけ)
1	CA1	1.0
2		1.3
3		1.6
4		1.8
5	CA2	2.0
6		2.3
7		2.6
8		2.8
9	CA3	3.0
10		3.3
11		3.3 (10と11が同等の場合には3.6を飛ばして)
12		3.8
13	CA4	4.0
14		4.3
15		4.6
16		4.8
17	CA5	5.0
18		5.3
19		5.6
20		5.8

3 or 4 [差 1.0] VS. 3.8 or 4.0 [差 0.2]

PD spectrum for chronic hepatitis in liver biopsy specimens

慢性肝炎のgrading/staging (新犬山分類)

壊死炎症の活動性(activity, grading) interface肝炎と肝小葉内の壊死炎症を中心にスコア化される。

A0: これらの病変がほとんどない。

A1: 門脈域の炎症に加え、肝小葉の壊死炎症反応(軽度)があるが、interface肝炎(ほとんどみられない)。

A2: 肝小葉の壊死炎症反応(軽度から中等度)、あるいはinterface肝炎(軽度から中等度)。

A3: 肝小葉の壊死炎症反応(中等度から高度)、あるいはinterface肝炎(中等度から高度)。

線維化・病期(fibrosis, staging) 主に肝線維化の程度と肝小葉構造の変化でスコア化される。

F0: 門脈域の線維化がほとんどない。

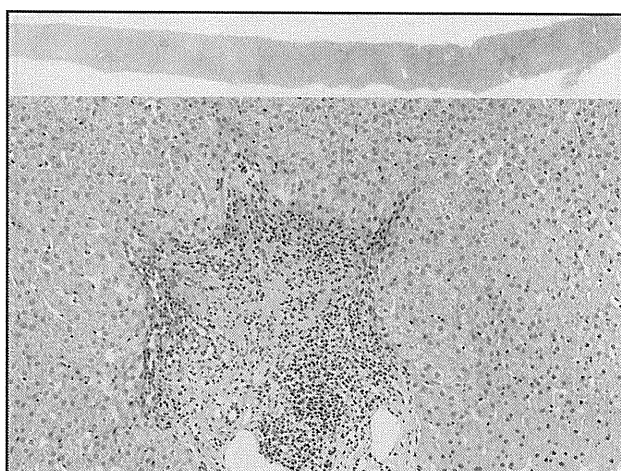
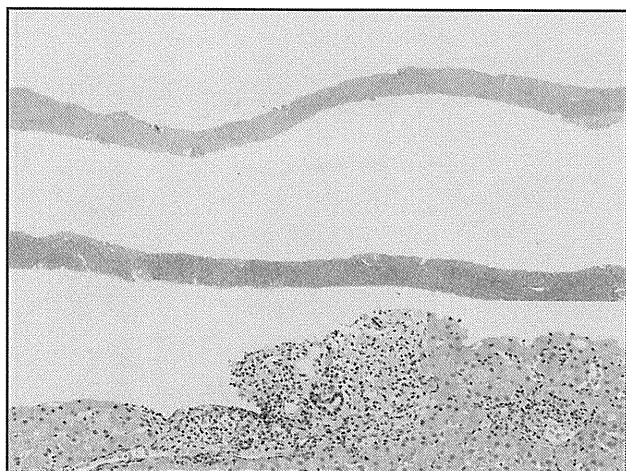
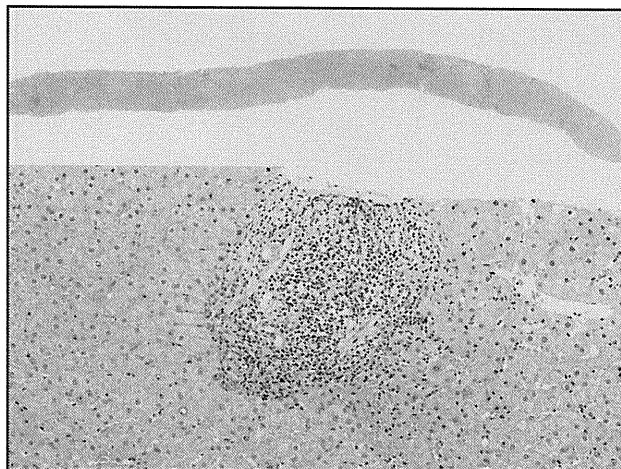
F1: 門脈域の線維化をみるが、肝小葉辺縁部への線維化の進展がほとんどない。

F2: 門脈域の線維性拡大、肝小葉辺縁部への線維化、種々の線維性隔壁形成(時々架橋性)を見るが、小葉構造の改変がほとんどない。

F3: 種々の線維性隔壁形成や架橋性線維化に加え、小葉構造の改変や結節化をみる。

F4: 再生結節の形成と線維化をみる。

CH F0-1



CH F2-

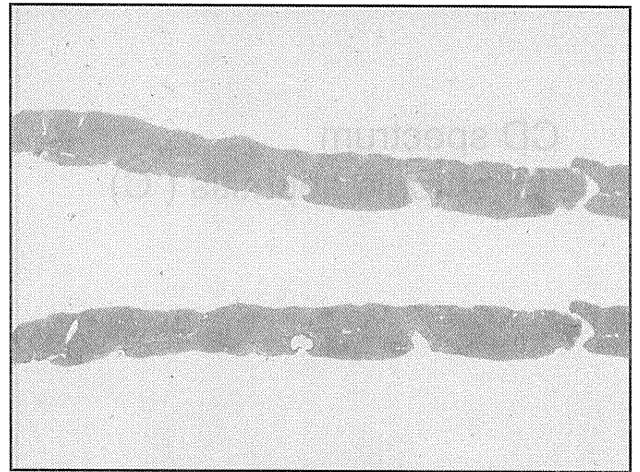
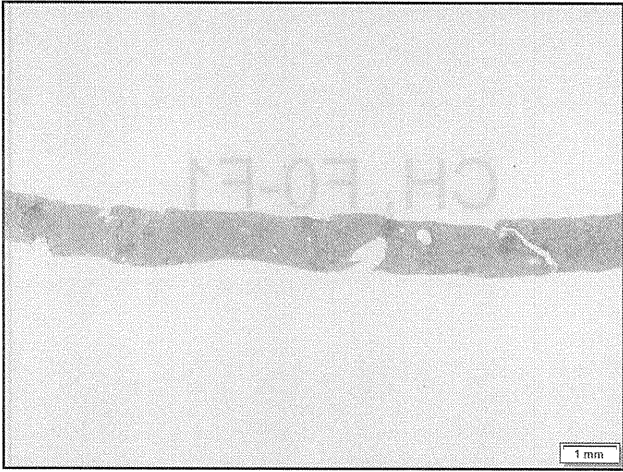
線維性架橋形成

線維性架橋

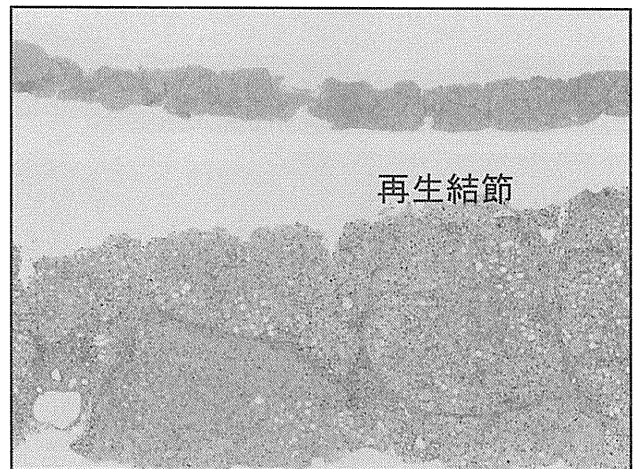
隔壁形成

CH F3-

小葉構造の歪み

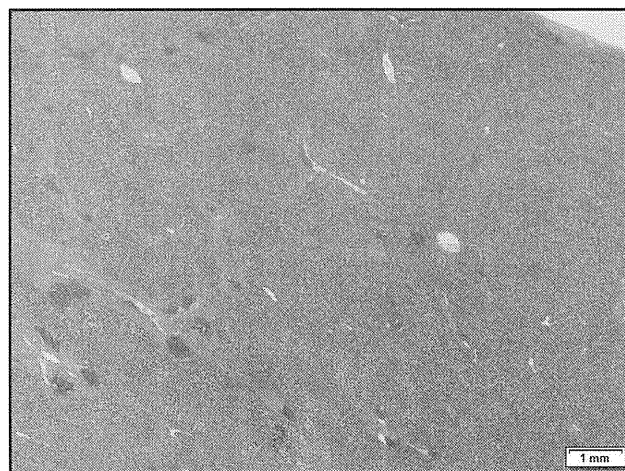
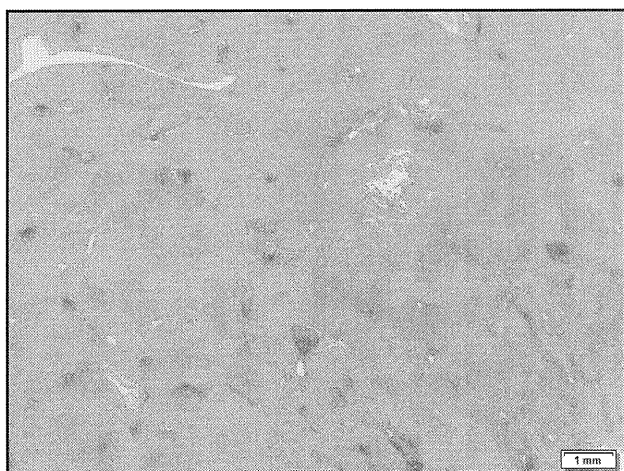
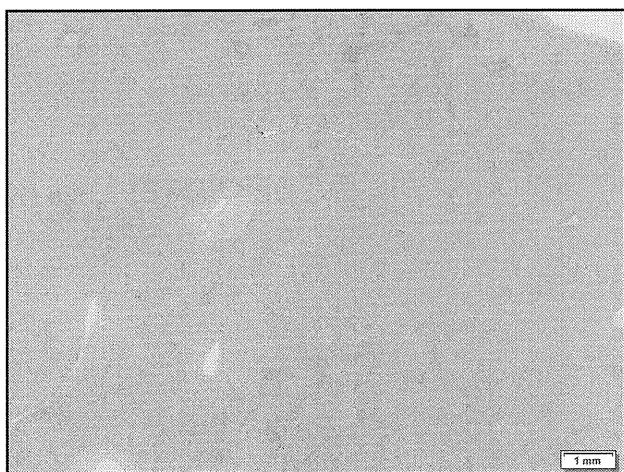


CH F4
(Liver cirrhosis)

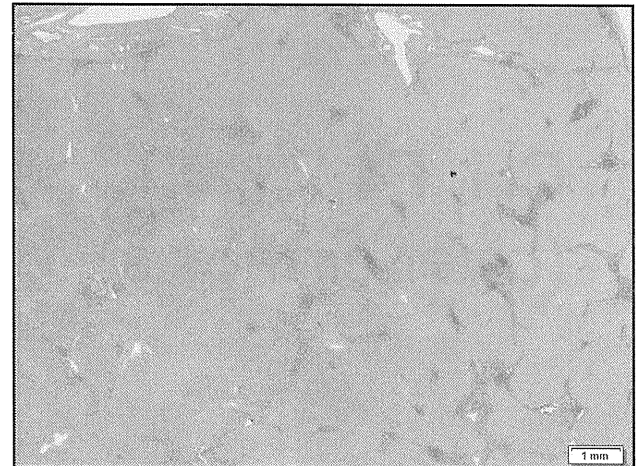
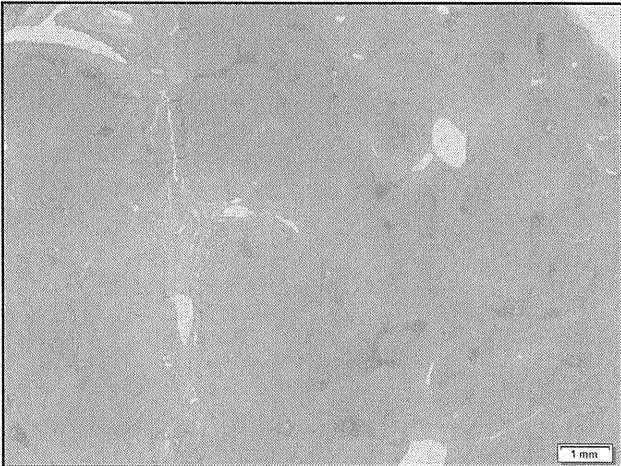
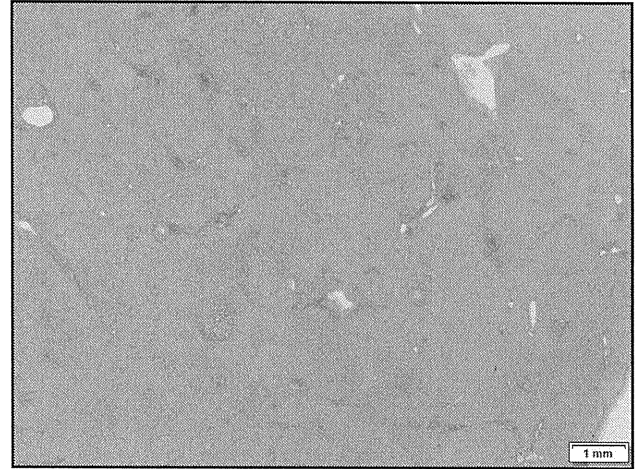


CD spectrum
for chronic hepatitis (C)

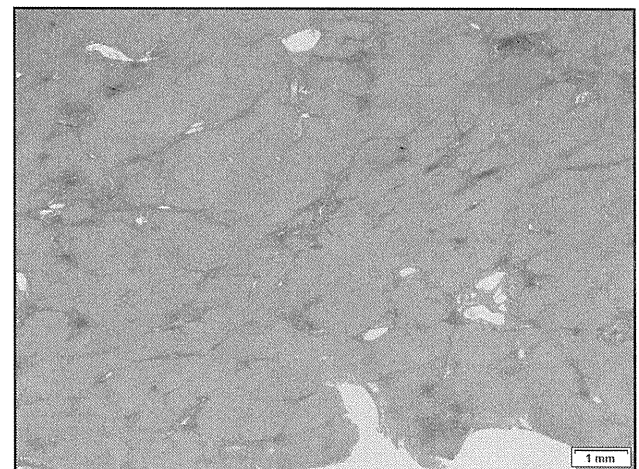
CH, F0-F1

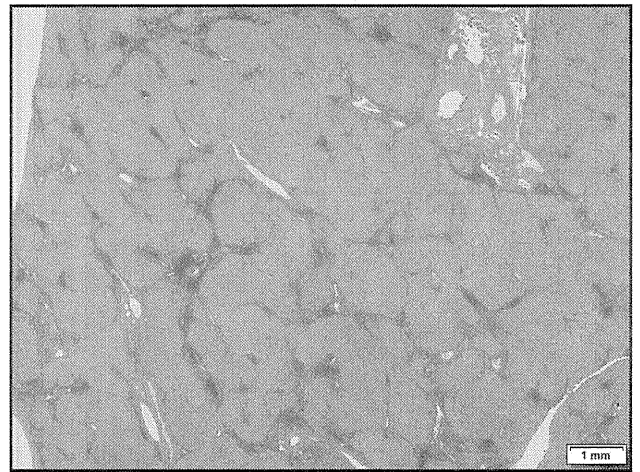
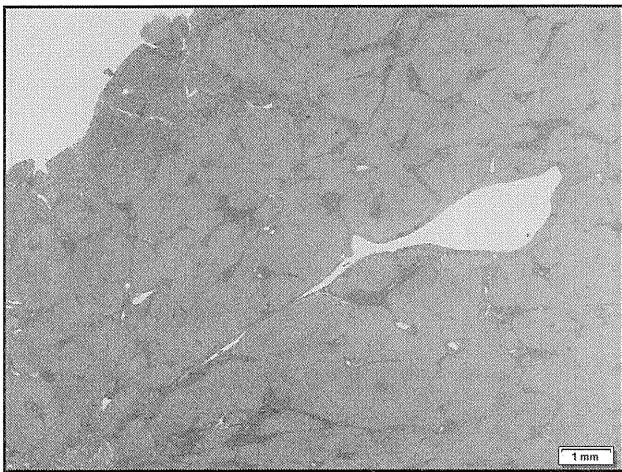


CH, F2 ?

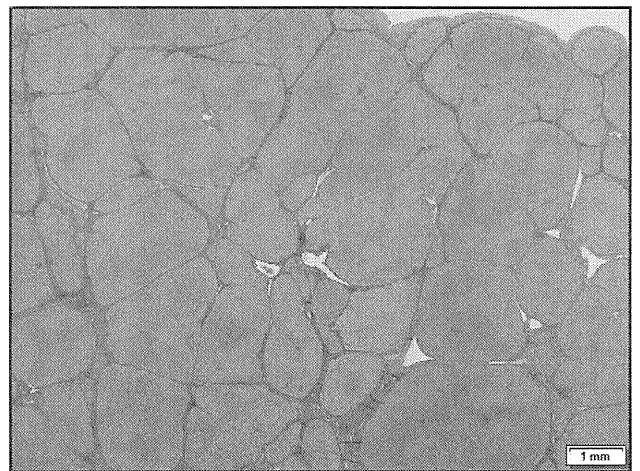
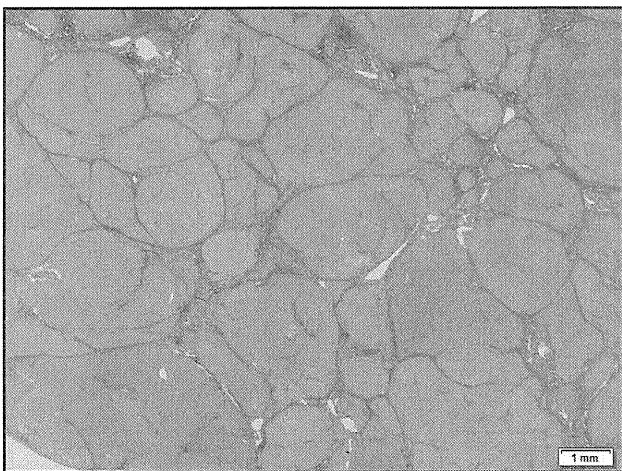
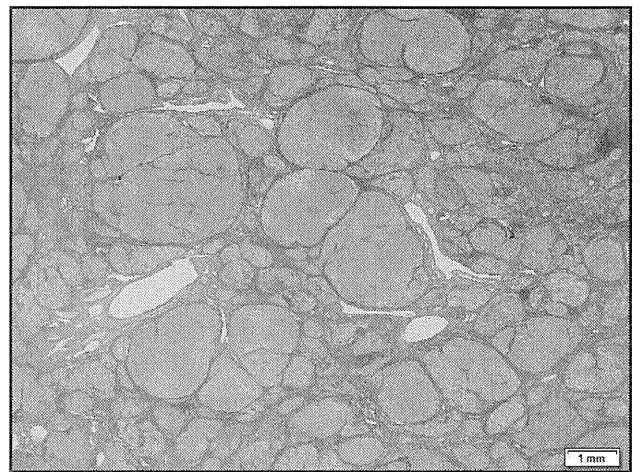


CH, F3 ?



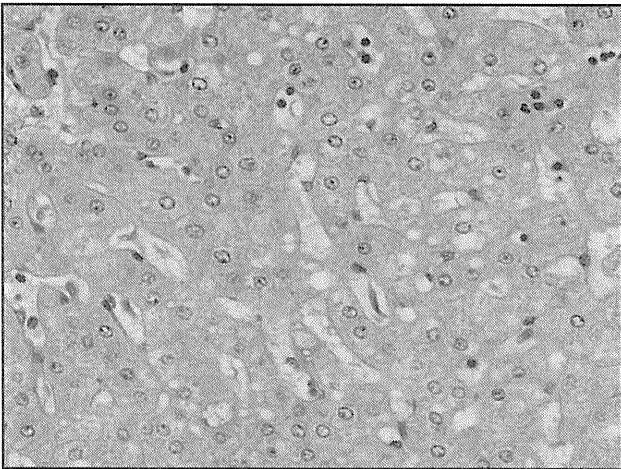


CH, F4 ?
(Liver cirrhosis)

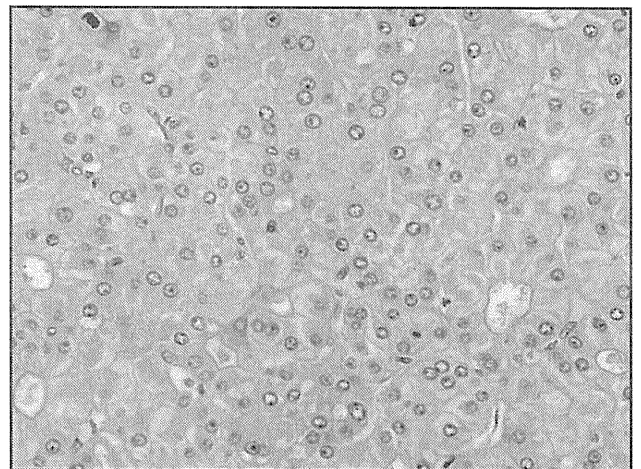
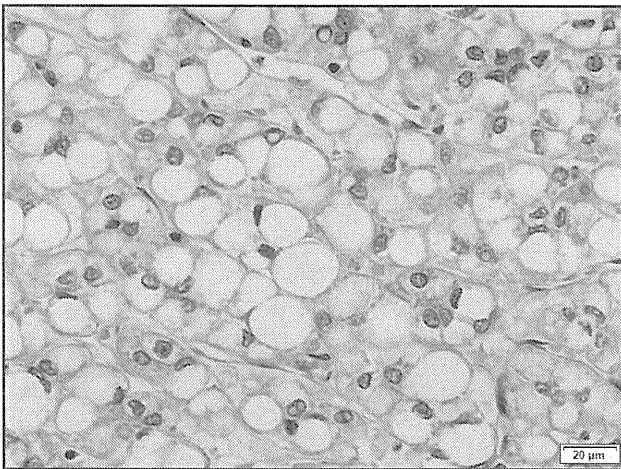


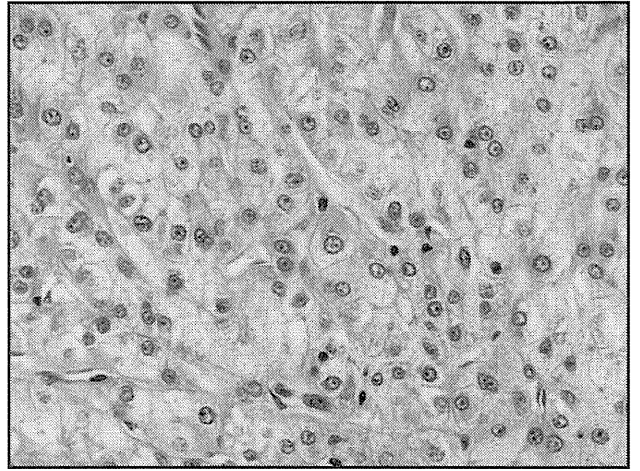
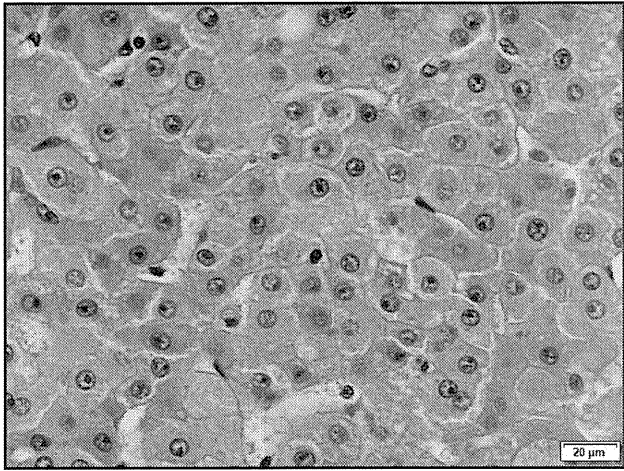
PD spectra
for HCC nuclear grading

Liver,
Non-neoplastic

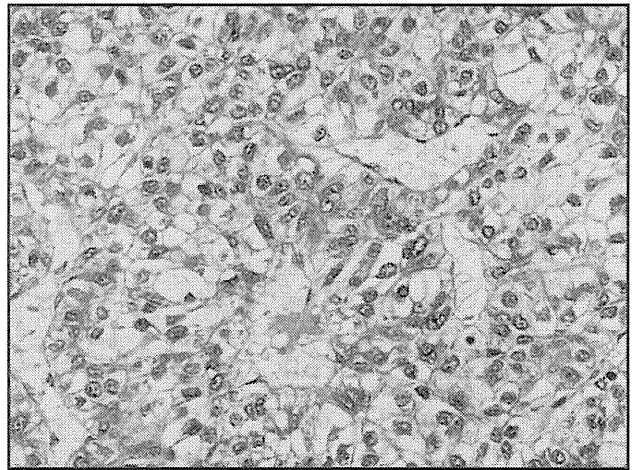
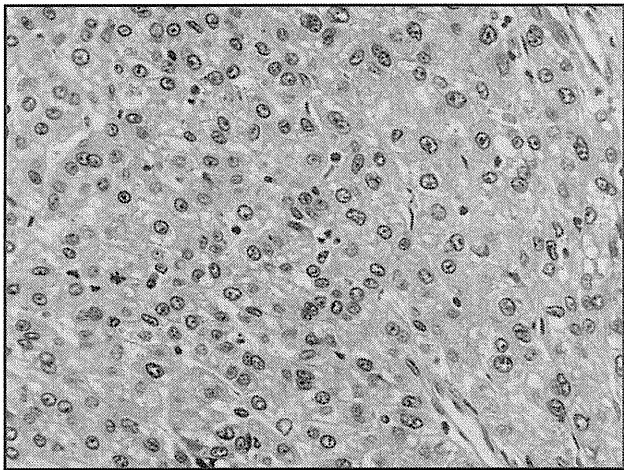
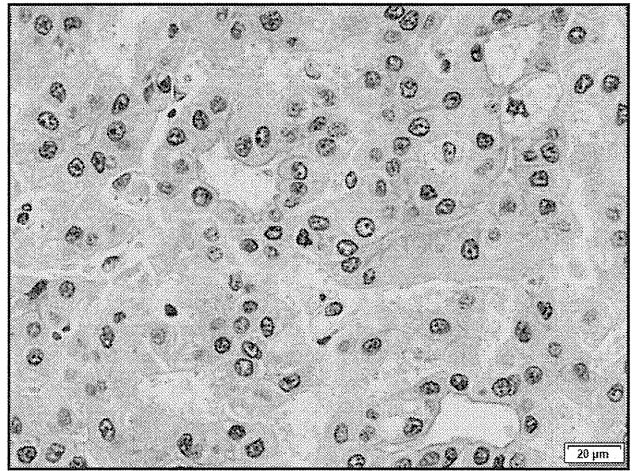


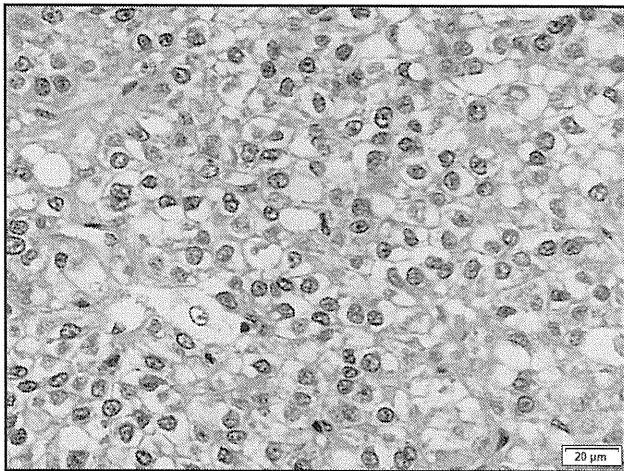
Dysplasia
HCC Grade 1



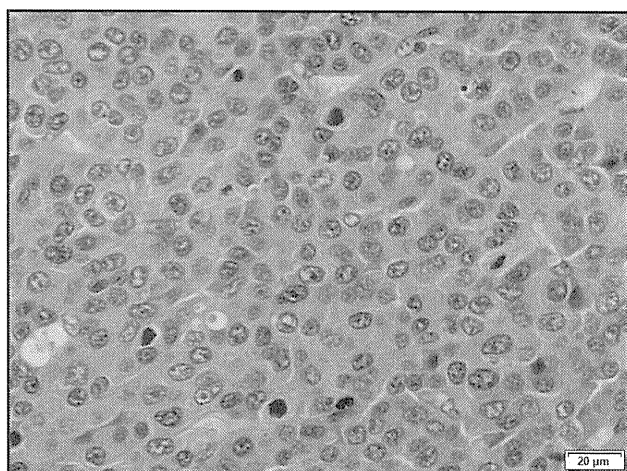
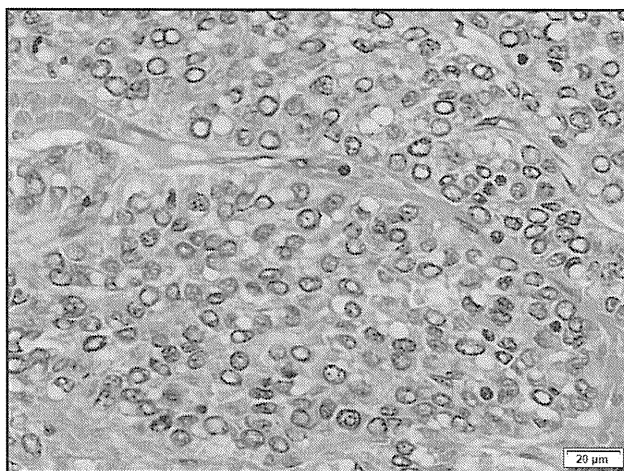
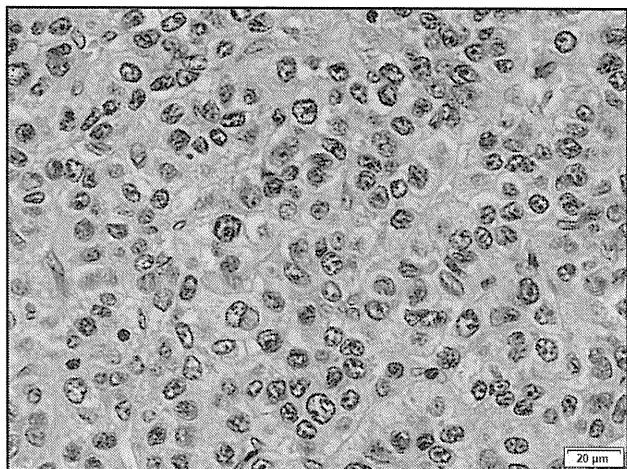
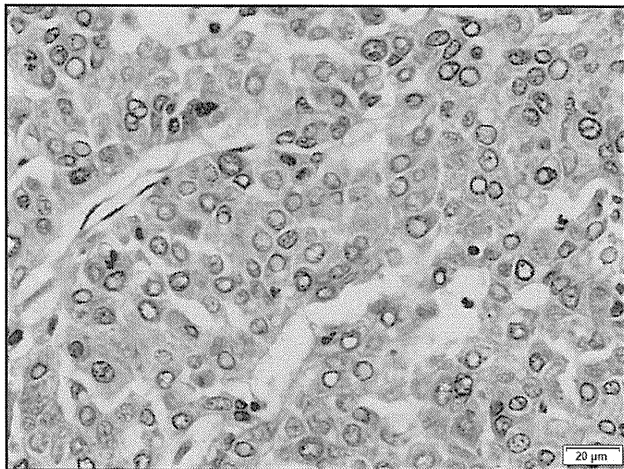


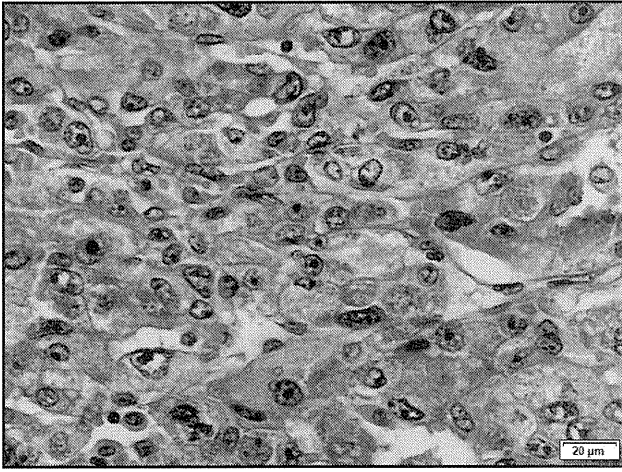
HCC grade 2-



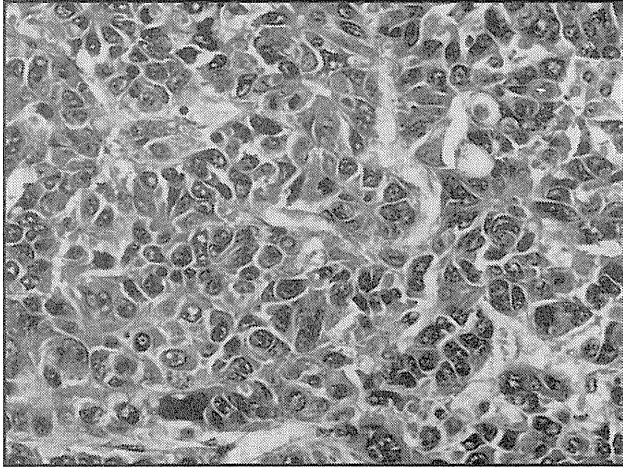
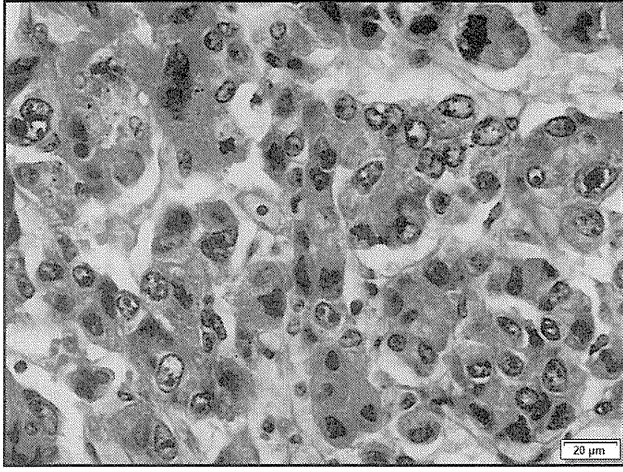
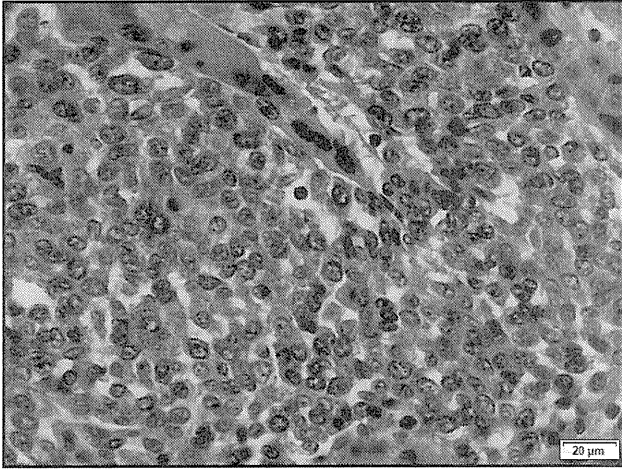


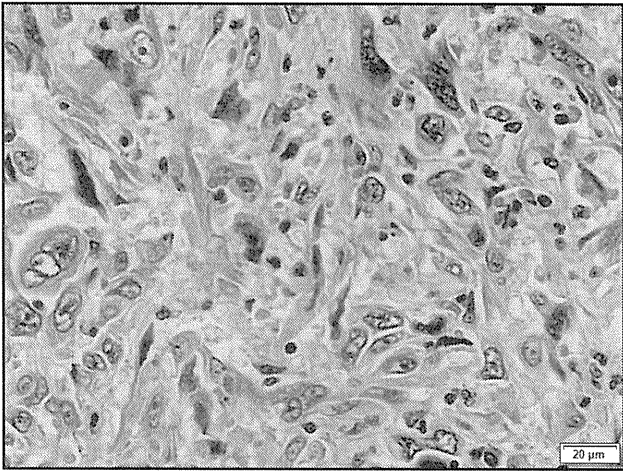
HCC grade 3-





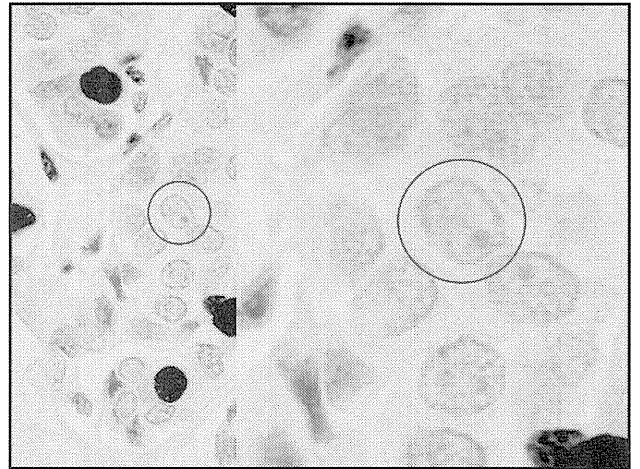
HCC grade 4





Ki-67 PD spectrum for
Breast cancer VS12-299
Using VS
X40 & x100

Ki-67 (—)
Cell cycle G0-G1



Ki-67(±)
Cell cycle G0G1→G1

