

第3回

内分泌病理領域における病理組織像の定量的画像解析

東北大学大学院医学系研究科 病理診断学分野

山崎有人、渡邊裕文、笹野公伸、鈴木貴

・はじめに

本企画第1回において述べられているように近年のAI (Artificial intelligence) 技術の医学領域への導入課題の一つに画像認識が挙げられており、病理組織診断への応用はその最終目標とも言える。しかし、我々病理医は日常業務において生検検体や手術検体、更には細胞診検体等の検索対象となる標本は多岐にわたる。特に生検検体のような微小な組織においては経験豊富な病理専門医間でも variance が生じやすく、形態学的所見一つをとっても、それを有意とするか否かは診断者によって様々である。

内分泌領域の疾患の病理診断にあてはめても、副腎皮質腫瘍の悪性度を評価する Weiss criteria は1984年に Laurence M Weiss らが提唱して以来、30年以上に渡りこれ以上のものがない gold standard として最も汎用されている [1] が、9項目 (nuclear atypia, mitosis, atypical mitosis, eosinophilic cytoplasm, diffuse architecture, capsular invasion, venous invasion, sinusoidal invasion, coagulation necrosis) 全てが形態学的所見のみによって構成され、上記9項目のうちの多くは病理医間の inter—observer variance が問題になる事は度々報告されてきた。

近年では、上記のような診断者間 (inter-) あるいは同一診断者内 (intra-) における observer variance の最小化や再現性向上において画像解析ソフトによる評価も行われだそうとしている。また、これらの画像解析ソフトを用いた評価は従来困難であった病理形態像を含む病理組織学的所見を定量化する事にも優れる。

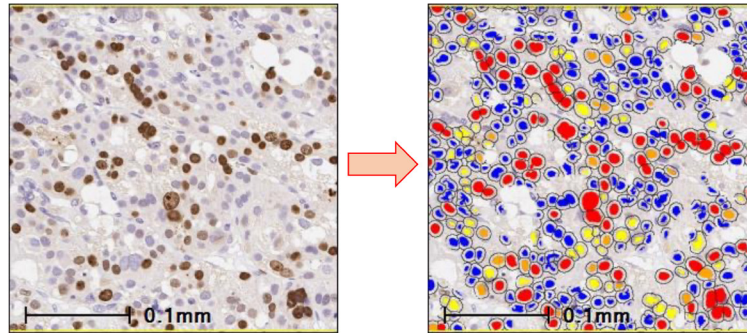
そこで本稿では AI 技術の内分泌病理診断領域への第一歩として、内分泌腫瘍 (特に副腎皮質腫瘍) や膵消化管神経内分泌腫瘍において重要な治療標的因子や予後予測因子となる免疫組織化学的バイオマーカーの画像解析ソフトを用いた解析の実際を各マーカーの細胞内局在 (核・細胞質・細胞膜) 毎に分けて、どのように評価で

きるのかを紹介する。

1. 核抗原マーカーの解析 (副腎皮質癌における Ki-67 標識率) [2]

核局在性のマーカーは乳癌等で重要なバイオマーカーとされるステロイドホルモン受容体である ER (Estrogen Receptor) や PgR (Progesterone Receptor) 等の核内受容体の他、p53 や p16 等のような細胞周期に関与するマーカー、TTF-1, GATA-3 等の転写因子等、多岐に渡り、その評価方法もマーカー毎に非常に多岐に渡る。核抗原の代表的な評価法の一つとして、Ki-67 標識率のように labeling index として評価されるマーカー多く、ここでは、副腎皮質癌の Ki-67 を例にとり概説する (図1)。

初めに、マーカーの細胞内局在に関係なく、どのマーカーにおいても核を中心として正しく細胞単位を認識させる作業は共通する。すなわち、図1の陰性細胞の核を正しく認識させる事から始まり、その際に考慮すべきパラメータは核の color/contrast (色調)、size (大きさ)、roundness (丸さ)、segmentation (細胞密度が高い領域において、近接する細胞の核を分けて認識させる作業) 等がある。基本的に多くの腫瘍性疾患では核はヘマトキシリンに濃染しており、カラーベクトルとして「青~紫」を示す。稀に核濃染性を示さない症例や核小体が明瞭化するような症例、核の大小不同が著しい症例等ではパラメータの詳細な調整が必要となる。核のカラーベクトルを決定後、酵素抗体法による DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 発色標本であれば、「茶」のカラーベクトルを核局在性陽性像のテンプレートとして認識させる。この際に、染色強度の半定量化 (negative, weakly positive, moderately positive, strongly positive) を行う際は上記のカラーベクトルにおける染色強度の閾値を設定する。図1は前述の如く、染色強度毎の閾値を4段階に設定した際の解析画像である。単に Ki-67 標識率を算



<パラメータ設定>

- ・核の染色性 (Color・Contrast: 陽性・陰性の抽出)
- ・核の大きさ (Size: リンパ球・間質の除外)
- ・核の丸さ (Roundness: 線維芽細胞の除外)
- ・核のくびれ (Segmentation: 重なり合う核を分離)

- : 陰性細胞の核
- : 陽性 (1+) 細胞の核
- : 陽性 (2+) 細胞の核
- : 陽性 (3+) 細胞の核

図1 副腎皮質癌における Ki-67 標識率の解析

出する場合には染色強度毎の閾値を設定する事はなく、陽性の閾値のみを設定すれば良い。

2. 細胞質抗原マーカーの解析 (副腎皮質腫瘍におけるステロイド合成酵素) [3]

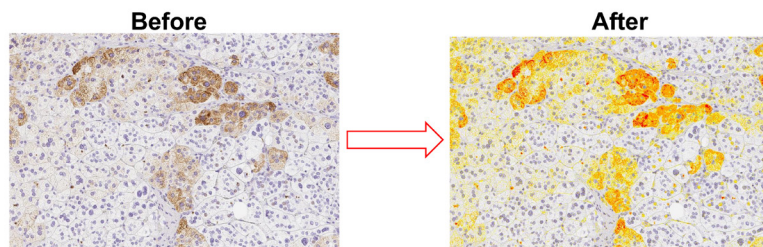
従来、細胞質抗原マーカーの半定量的解析方法として H-score や IRS (immunoreactivity score) 等が提唱、汎用されており、画像解析においてもこれらの解析手法の原則は同様である。一方細胞質抗原マーカーの検索にあたっては細胞単位としての陽性像を解析する手法 (従来の H-score や IRS に相当する手法) に加え、陽性像の面積も解析する事が可能となる。そこでここでは副腎皮質

腫瘍におけるステロイド合成酵素の発現を例にして、概説する。1. 核抗原マーカーの解析に記載の通り、正しく細胞単位を認識させる作業は同様であり、細胞単位として陽性像を解析するアプローチの場合は、陽性像の局在を「核」から「細胞質」に変更し、同様のステップを踏む。一方陽性像の面積に関しては、図2に示すようにアルドステロン産生腺腫における CYP11B2 の陽性像を染色強度により、定量的に陽性像を面積として算出する事も可能である。また、核はヘマトキシリンにより「青～紫」に染色されており、このカラーベクトルを予め除いた領域にしておけば、細胞質領域のみに注目した解析が可能となる。

~ DIAによる免疫組織化学的定量化解析 ~

CYP11B2 immunoreactivity ;

DAB 染色強度による半定量化



H-SCORE = $\sum (\text{Stained area} \times \text{Score } 1+, 2+, 3+) / \text{Whole tumor area}$
Negative : 0, Weak (Yellow) : +1, Moderate (Orange) : +2, Strong (Red) : +3

図2 アルドステロン産生腺腫における CYP11B2 の解析

細胞質領域にのみ着目し、単位面積当たりの染色強度を算出する事が可能である。陽性所見の染色強度毎の半定量化は 1. 核抗原マーカーの解析に記載の通り、4段階 (negative, weakly positive, moderately positive, strongly positive) で可能である。

3. 細胞膜抗原マーカーの解析（膵神経内分泌腫瘍における SSTR2） [4]

細胞膜抗原マーカーは乳癌や胃癌における HER2、神経内分泌腫瘍における SSTR2 の他、近年では種々の悪性腫瘍における PD-L1 等、治療標的因子としてのコンパニオン診断マーカーが多く登場してきている。しかしながら、これらの細胞膜抗原マーカーの評価方法はマーカーや疾患毎によって種々多様である。一方で、いずれの評価方法にも共通しているのが「(全) 周性 (circumference)」の概念であり、細胞膜抗原マーカー

の陽性所見を評価する上で特徴的と考えられる。ここでは、内分泌病理領域で重要な代表的細胞膜局在性マーカーである SSTR2 の膵神経内分泌腫瘍における画像解析方法を紹介する (図 3)。1. 核抗原マーカーの解析に記載の通り、正しく細胞単位を認識させる工程は抗原の局在によらず同様であり、陽性像の局在を「細胞膜」として、同様のステップを踏む。ただし、マーカーの種類や標本の染色性によっては陽性像が細胞質にも局在する事があり、このような場合には正確な細胞膜所見のみに限った解析は困難な場合がある事も注記しておく。

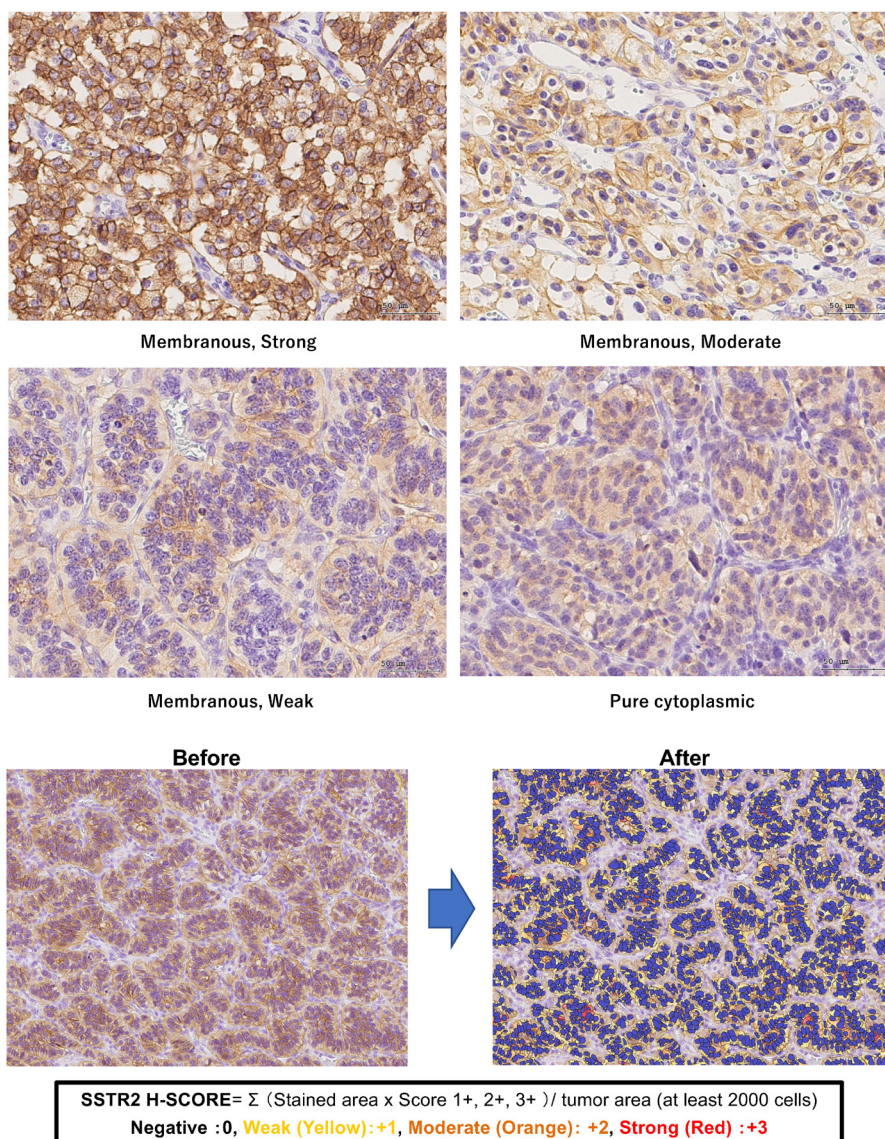


図3 膵神経内分泌腫瘍における SSTR2 の解析

陽性所見の染色強度毎の半定量化は 4 段階 (negative, weakly positive, moderately positive, strongly positive) で可能である。細胞膜の circumference についても閾値が必要であり、0-100% の値を入れる (0% の場合は少しでも細胞膜陽性所見があれば、陽性とみなす。一方で 100% の場合は少しでも細胞膜において陰性の部分があれば、陰性とみなす。) なお、文献 [4] では circumference の閾値を 0% とした際に manual 評価と最も一致した結果となった。

4. 形態学的所見（副腎皮質腫瘍における淡明細胞 vs. 緻密細胞の割合） [3]

定量的画像解析において最も困難であるのが形態像である。形態像においては前述の免疫組織化学のようにカラーベクトルに基づく染色強度等の客観的パラメータが存在する訳ではないため、定量的な評価が極めて困難な要素と考えられるが、種々の要素を組み合わせる事により、画像解析でもある程度の定量的な形態像の解析が出来る。ここでは、副腎皮質腫瘍における淡明細胞 vs. 緻密細胞の割合を例にとり、概説する。形態学的所見の定量的解析は前項 1～3. のようにカラーベクトルのみでは困難であり、図 4 に示すように複数のステップに分けて多段階的な解析を要する。まず初めに図 4-1. に示す

ように組織学的構成要素を構築パターン（形成する胞巣や構成する細胞の形状等）に基づき、パターンを認識させる事で分類する。これは AI 前段階のプロトタイプとしてのパターン学習であり、詳細なパラメータ設定というよりも、同様ないしは類似したパターンを認識させる事で帰納的に組織学的構成要素を分類する。その後、図 4-2, 4-3 に示すようにパターン分類に基づき分類された組織学的構成要素のみに着目して、その中でカラーベクトルの違いによる構成要素（核や細胞質等）を定量的に解析する事が可能である。解析の全体像としては図 4-4. に示すような多段階的解析により、形態学的所見においてもある程度定量的解析が可能となる。

～ DIAによる病理組織学的定量化解析～

1st step: “腫瘍組織” vs. “間質組織” ;
...組織学的構築パターンの違いによる

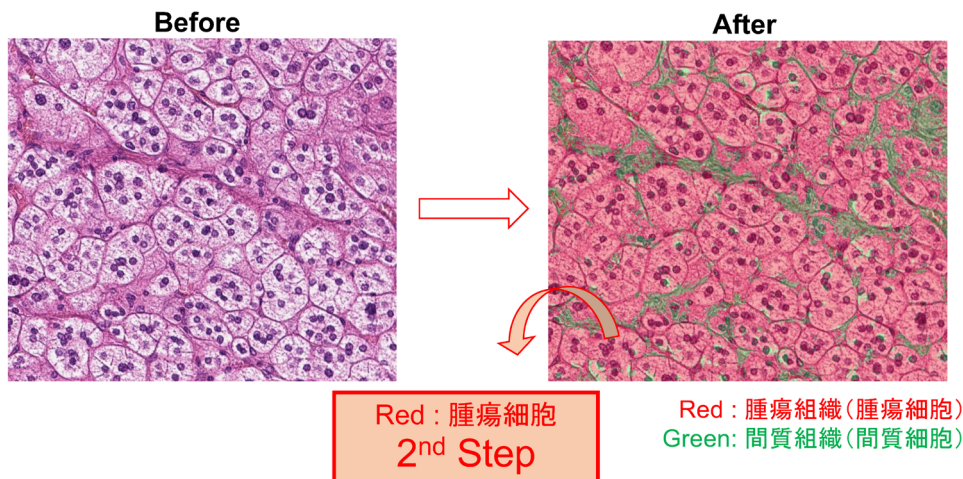


図 4-1 組織構築のパターンの違いによる組織要素の分類

～ DIAによる病理組織学的定量化解析～

2nd step: 細胞質 vs. 核 ;

...色調 (color spectrum) の違いに基づく分類; “pink” vs. “purple”

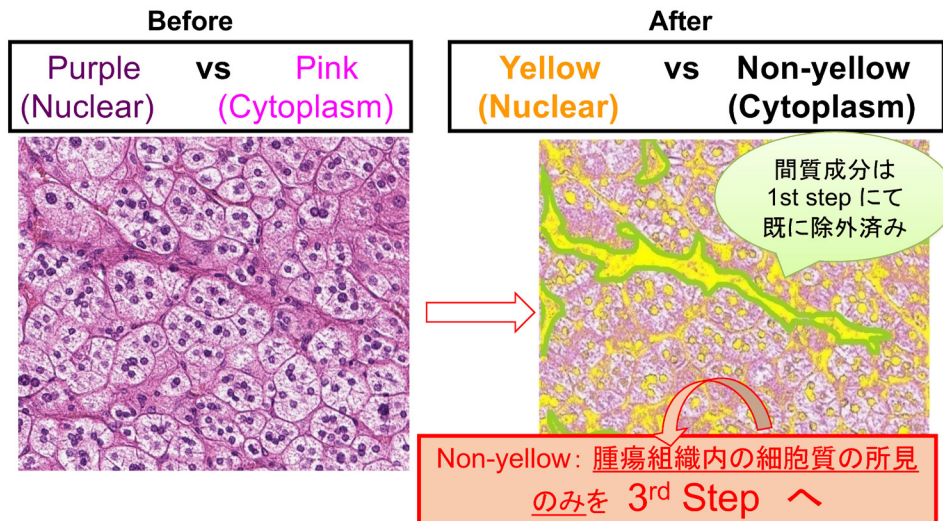


図4-2 カラーベクトルの違いによる細胞質と核の分類

～ DIAによる病理組織学的定量化解析～

3rd step : Clear cell vs. non-clear cell (Compact cell)

... pink color の強度に基づく分類

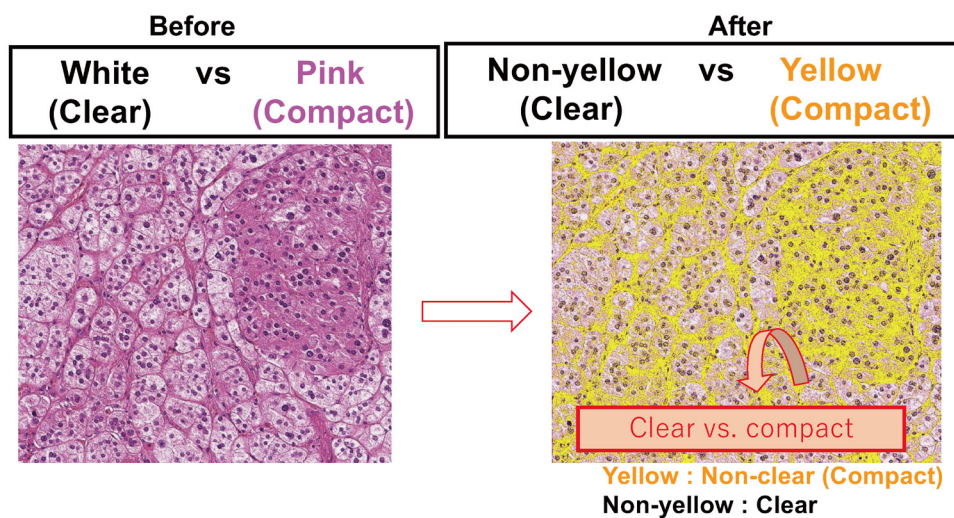


図4-3 更に細胞質領域において、カラーベクトルの違いによる淡明細胞と緻密細胞との分類

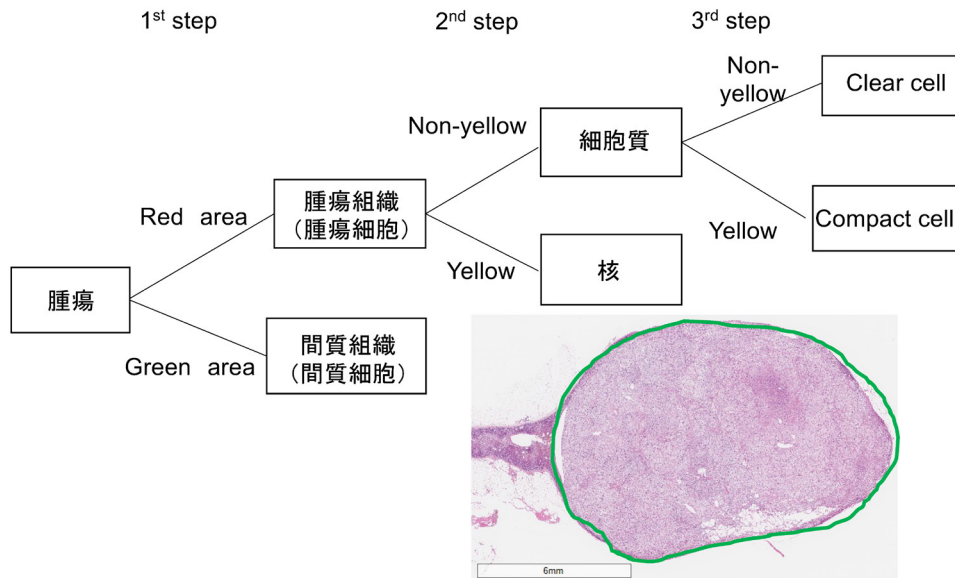


図4-4 多段階的病理組織像の定量的画像解析プロセス

・終わりに

本稿では内分泌病理領域における病理組織像の画像解析の応用について、免疫組織化学、形態像それぞれについて、例を用いて紹介した。解析パラメータ設定等の工程については画像解析ソフトやプログラムによって細部は異なる事は付記しておく。免疫組織化学では抗原の局在のみならず、マーカー毎によって臨床因子と関連する評価方法が異なる時代となっており、評価者間の相違や、評価方法の均霈化・再現性については今後も検討すべき課題と言える。このような中で画像解析による病理組織像の評価は客観性や精度の課題は残るものの、再現性は高い。今後、内分泌病理領域においても新たな治療標的因子や予後因子が発見され、病理組織標本を用いたマーカーの評価は日常診療上も簡便な手法として実用性が高いのは言うまでもない。画像解析は解析手法の一つではあるが、評価項目、評価方法の多様化に耐え得る解析システムの確立に今後大いに期待が寄せられる。

【参考文献】

- [1] Weiss LM. Comparative histopathologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984; 8: 163-169.
- [2] Yamazaki Y, Nakamura Y, Shibahara Y, Konosu-Fukaya S, Sato N, Kubota-Nakayama F, Oki Y, Baba S, Midorikawa S, Morimoto R, Satoh F, Sasano H. Comparison of the methods for measuring the Ki-67

labeling index in adrenocortical carcinoma: manual versus digital image analysis. *Hum Pathol.* 2016; 53: 41-50.

[3] Yamazaki Y, Omata K, Tezuka Y, Ono Y, Morimoto R, Adachi Y, Ise K, Nakamura Y, Gomez-Sanchez CE, Shibahara Y, Kitamoto T, Nishikawa T, Ito S, Satoh F, Sasano H. Tumor Cell Subtypes Based on the Intracellular Hormonal Activity in KCNJ5-Mutated Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension.* 2018 Sep;72(3):632-640.

[4] Watanabe H, Ide R, Yamazaki Y, Fujishima F, Kasajima A, Yazdani S, Tachibana T, Motoi F, Unno M, Sasano H. Quantitative digital image analysis of somatostatin receptor 2 immunohistochemistry in pancreatic neuroendocrine tumors. *Med Mol Morphol.* 2021 Dec;54(4):324-336.