

病理組織所見のデジタル化

Digitization of histopathological findings with grades

手塚友季恵¹⁾, 中島早紀¹⁾, 松本佳奈^{1),2)}, 中根冨^{1),2)}

指導教官 梅村隆志^{1),2)}

1) ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物病理学研究室

2) 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

キーワード：病理所見・デジタル化・画像解析

[目的] 近年、化学物質の安全性評価手法として、投与用量と毒性発現率の相関性に数理モデルを適用し、統計学的にもっともフィットしたモデルを用いて、有意な影響を引き起こす用量 (benchmark dose) を算出するベンチマークドーズ法が注目されている。この時用いられる毒性発現率は体重などの数的変化あるいは発がん性などの発現頻度 (二値データ) の数値が用いられる。この新しい評価手法を一般毒性試験で用いられる病理所見データに適用範囲を広げる試みが模索されているが、病変の程度を観察者の印象によりグレード付けするなどの病理所見の特殊性が大きな障害となっている。一方、顕微鏡下の病理組織をデジタル化して処理し、将来的には AI 技術などを組織診断に応用しようとする動きもある。いずれにしても、病理組織学の世界にデジタル化の波が押し寄せている現状がある。本研究では、いくつかの病理所見に対して、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) 標本を用いて常法に従ったグレード付けによる解析、画像解析装置を用いた切片面積当たりの切片上の病変数の解析、さらには病変特異的蛋白を検出する免疫染色標本を用いた画像解析処理による解析結果を比較して、病理所見のデジタル化におけ

る問題点を検討した。

[方法]

日本エスエルシー株式会社 (静岡県) から購入した 5 週齢の雄 F344 系ラット 20 匹を各郡 5 匹に配し、Control 群、1.25%Acetamide 群、2.5%Acetamide 群、5%Acetamide 群に設定した。東京化成工業株式会社 (東京都) から購入したアセタミドをオリエンタル酵母工業株式会社 (東京都) から購入した基礎飼料の CRF-1 と混和し、試験期間中自由に摂取させた。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス株式会社 (東京都) のソフトチップを用い、週 2 回の交換を行った。イソフルラン麻酔科で剖検後、肝臓を摘出し、ホルマリン固定を行った後、常法に従ってパラフィン切片を作成し、病理組織学的検査のために HE 染色を行った。各群 5 枚のスライド、計 20 枚について鏡検した。病理組織学的所見として、「封入体」、「アポトーシス」、「有糸分裂象」の 3 つの病変についてそれぞれグレード付けによる所見の収集を行った。また鏡検時には盲検により群構成の情報未知のまま実施した。グレード付けは、病変が多い場合には+++、中間の場合には++、少な

い場合には+とした。また、その後の処理として、+++を3、++を2、+を1として数値化し、群ごとにその平均値を求めた。一方、デジタル化データの収集は病変ごとに標本上のすべての病変をカウントし、画像解析装置で計測した切片の総面積で徐して、群内の個体ごとに数値を求め、群としてはその平均値と標準偏差を求めた。

【結果】 病理組織学的検査のグレード付けでは、封入体は Control 群 (0%) で 1.2、1.25% 群で 2、2.5% 群で 2、5% 群で 2.6、アポトーシスは Control 群で 1、1.25% 群で 1、2.5% 群で 2.4、5% 群で 1.2、有糸分裂像は Control 群で 1.2、1.25% 群で 1.2、2.5% 群で 2.8、5% 群で 1 となった。(表 1)。個体ごとの病変の数をカウントし、画像解析ソフトで切片の面積で徐した結果、封入体は Control 群で 0.23 ± 0.36 、1.25% 群で 1.09 ± 0.77 、2.5% 群では 3.97 ± 0.83 、5% 群では 7.27 ± 3.57 、アポトーシスは Control 群では 0.04 ± 0.01 、1.25% 群では 0.08 ± 0.03 、2.5% 群では 2.05 ± 1.28 、5% 群では 0.43 ± 0.54 、有糸分裂像は Control 群では 0.12 ± 0.06 、1.25% 群では 0.09 ± 0.12 、2.5% 群では 1.54 ± 0.29 、5% 群では 0.08 ± 0.11 となった。(表 2)。

表 1

| 用量(%) | 0 | 1.25 | 2.5 | 5 |
|--------|-----|------|-----|-----|
| 封入体 | 1.2 | 2 | 2 | 2.6 |
| アポトーシス | 1 | 1 | 2.4 | 1.2 |
| 有糸分裂像 | 1.2 | 1.2 | 2.8 | 1 |

表 2

| 用量(%) | 0 | 1.25 | 2.5 | 5 |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 封入体 | 0.23 ± 0.36 | 1.09 ± 0.77 | 3.97 ± 0.83 | 7.27 ± 3.57 |
| アポトーシス | 0.04 ± 0.01 | 0.08 ± 0.03 | 2.05 ± 1.28 | 0.43 ± 0.54 |
| 有糸分裂像 | 0.12 ± 0.06 | 0.09 ± 0.12 | 1.54 ± 0.29 | 0.08 ± 0.11 |

【考察】 グレード付け所見に対して、グレードを単純に数値化して、その平均値を群の代表値とする考え方がある。今回はその方法

に従ってグレードのついた病理組織所見を数値化したところ、封入体では低用量と中間用量間では差は認められなかったが、これを画像解析装置による切片面積当たりの個数でみると中間用量は低用量の約 4 倍の増加が認められた。また、アポトーシスのグレード付け所見の単純数値化では対照群と低用量群では差異は認められていないがデジタル化数値では約 2 倍の増加が認められた。以上より、これまで提案されているグレード付け所見の単純数値化では病変の程度を正確に反映することはできないことが明らかとなった。今後はそれぞれの所見に特異的に発現する蛋白を免疫染色により検出し、その標本を用いたデジタル化を実施し、その他の方法と比較する予定である。