

# 口腔細胞診の画像解析と統計的解析——小規模解析

伊藤 淳子<sup>1)</sup> 河原 栄<sup>2)</sup>

**要 旨**：口腔擦過細胞診の有用性が主張され、その件数が年々増加しているが、他臓器と比べ、良悪の判定がより困難である。細胞診でのより普遍的でより特異度と感度の高い判定基準を確立するためには、形態を定量的に解析することが必要である。そこで口腔扁平上皮癌の判定に重要なオレンジG好性扁平上皮細胞について、ImageJを用いて画像解析し、癌細胞と判定できる形態の因子の抽出を試みた。組織学的に診断された扁平上皮癌症例と良性症例について、同条件下で撮影された擦過細胞の画像を用いて、核面積、細胞面積、核のヘマトキシリン濃度、オレンジG好性細胞の輝度、核・細胞質比(N/C比)、核の記述子(不整の程度)を計測した。統計的に有意だった項目をROC曲線で解析すると、細胞質の面積とN/C比、核の濃度、細胞質の輝度の因子の順に有用と考えられた。ベイズ法で悪性の判定のための事後確率を計算すると、N/C比あるいは細胞質の面積単独による判定ではそれぞれの事後確率が0.38、0.40と低かったが、4項目をすべて判定のために用いると事後確率が0.97となり、これらの項目をすべて考慮して総合的に考えることが必要不可欠と考えられ、また、よりよい判定基準の作成に寄与するものと考えられた。

【Key words】 擦過細胞診、口腔扁平上皮癌、画像解析、ROC曲線、事後確率

## 緒 言

我が国の口腔がんおよび咽頭がんの死亡数は全悪性新生物の死亡数の2.4%を占め、年々増え続けている<sup>1-3)</sup>。口腔がんの90%以上<sup>4)</sup>を占める口腔扁平上皮癌は、国により大きく差があり、南アジアや欧米に多く日本ではかなり少ないが、死亡率は日本と欧米は同程度となっており<sup>4)</sup>、罹患者の死亡率が高いと考えられ、死亡率の低下が求められる。死亡率の低下のためには口腔扁平上皮癌の早期発見と正確な診断が必要である。早期発見に有用と考えられる口腔がん検診は1980年代からヨーロッパやインドで先行し、死亡数の低下に寄与していることが示されてきた<sup>5,6)</sup>。同時にがんのスクリーニングに擦過細胞診が有用であることも示されてきた<sup>7-9)</sup>。続いて日本でも口腔がん検診がはじまり、当院でも口腔擦過細胞診の件数が年々増加している。

口腔扁平上皮癌の診断に関する擦過細胞診の有用性が示されてきた<sup>9-12)</sup>。しかしながら比較的判定技術が高いと思われる日本の専門施設においても多くの疑陽性例があり<sup>10,12)</sup>、より感度と特異度の高い普遍的な判定基準が求められる。しかし、口腔扁平上皮癌では本質的に癌の判定が他臓器より困難であるという問題点を抱えている。すなわち、第一に口腔扁平上皮癌では表層に角化を示す表層分化型癌が大多数を占めているため、他臓器で見られるような癌の判定を容易にさせる深層型異型細胞が採取されにくい。第二に、上皮内癌/異形成/上皮内腫瘍の組織学的診断基準が確立されていないことも、細胞診の診断を困難にさせている<sup>4)</sup>。このように悪性細胞と良性細胞の形態学的差異が小さい場合、その違いを半定量的に表現して違いを表すことはしばしば困難である。そのために口腔がんでも定量的画像解析が散発的に為されてきたが<sup>13)</sup>、従来の画像解析装置は高価であり、普遍的

1) 福井総合病院 診療支援部 検査課 検査室

2) 福井総合病院 診療部 病理診断科

(採択日 2020年11月)

に用いることができるものではなく、また、解析できる要素が限られていた。

近年、無料で入手でき、しかもより多くの要素を解析できるアプリケーションが開発され、細胞形態を解析する多くの目的で限定的に用いられてきたが、細胞診の分野で多くの要素を解析した例はまだ少ない。この論文では、口腔擦過細胞診に有用な形態指標を抽出する目的で画像解析に統計学的解析を加えて解析する。

## 研究対象と方法

対象：2017年1月から2019年6月の期間に当院で判定が行われた口腔擦過細胞診のうち、組織学的に扁平上皮癌と診断された4例と良性病変3例を画像解析の対象とし、あらかじめ、扁平上皮癌と非腫瘍性病変の形態を比較するために健常者1名(著者の河原)の歯肉から採取した細胞を用いた。染色性の減衰の程度を知るためには、2年ごとに明らかな良性例1例を任意に抽出し、それぞれの標本の細胞の中から形態異常のない細胞を各5個選んで細胞質のオレンジG染色濃度を測定した。

方法：細胞採取のため綿棒にて病変部を擦過し、直ちにスライドガラスに塗抹し95%エタノール液にて湿潤固定を行った。採取された細胞は通法に従いPapanicolaou染色を施した。作製した標本を光学顕微鏡にて検鏡し、日本臨床細胞学会認定の1人の細胞診専門医(著者の河原)と2人の細胞検査士が、細胞判定結果報告時に複数の細胞検査士がスクリーニングした細胞の中から、正常と明らかに隔たりのあるオレンジG好性異常細胞を抽出して、高倍率(対物レンズ40倍)で写真撮影して、画像解析をした。各症例につき、良性病変では20-31個、悪性病変では18-29個解析をした。健常者ではランダムに85個の細胞を撮影して解析した。画像解析には米国のNIH<sup>14)</sup>で開発されたImageJを用いた。ImageJで用いられる用語の日本語訳の記載には三浦らの記載<sup>15)</sup>に基づいた。解析した項目は、核の面積と染色濃度の平均値、オレンジG好性細胞質の面積と輝度(濃度)の平均値および真円度(circularity,  $=4\pi \times \text{面積} / \text{円周の二乗}$ )、円形度(roundness,  $=4 \times \text{面積} / \pi \times \text{長軸の二乗}$ )、凸度(solidity,  $=\text{面積} / \text{凸包面積}$ )からなる核形不整の程度で、核・細胞質比(N/C比)は核面積と細胞面積から算出した。また、特異な色の染色性の評価のために、

ImageJにてRGBの色の3分割を行い、核のヘマトキシリンの濃度の評価にはblueの画像を、オレンジGの輝度の評価にはredの画像を用いた。なお、今回の解析をより単純化させるために、孤立散在性に出現する表層のオレンジG好性細胞のみを検索した。

統計：良性例すべての細胞(良性群)と個々の悪性例の4群のそれぞれの比較を行った。また、良性群と悪性例すべての細胞(悪性群)の2群の比較を行った。正規分布を示すと考えられる2群のデータ間の比較にはstudentのt検定を用い、多群の比較には一元配置分散分析を用い、有意差を示した場合の任意の2群間の比較にはTukey-Kramerの多重比較法を用いた。正規分布を示さないと考えられた2群の比較にはMann-Whitney法を、多群間の比較にはKruskal-Wallis法を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。以上の良性群と悪性群間で有意差のあった項目について、ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線を描いて各測定項目の有用性をAUC(area under the curve曲線下面積)にて比較し、また適切なカットオフ値を算出した。以上の群間の比較およびROC曲線の作成・解析のために統計解析ツールのRを用いた。統計的に有意な項目の良悪の判定のための確率を求めるためにベイズ法を用いた。すなわち、ベイズの定理により、Bが生じたときにAが生じる事後確率 $P(A|B)$ は

$$P(A|B) = \frac{P(A) \times P(B|A)}{P(B)}$$

全確率の法則より

$$P(B) = P(A) \times P(B|A) + P(\bar{A}) \times P(B|\bar{A})$$

これをベイズの定理の分母に代入すると

$$P(A|B) = \frac{P(A) \times P(B|A)}{P(A) \times P(B|A) + P(\bar{A}) \times P(B|\bar{A})}$$

事前確率 $P(A)$ は2017年1月から2019年6月の全症例中の癌例の頻度 $8\% = 0.08$ あるいは特定の項目の値が選ばれた時の事後確率、逆確率 $P(B|A)$ は癌細胞がそれぞれの項目でのROCで算出されたカットオフ値より大きいあるいは小さいすなわち悪性側にある細胞の比率、 $P(B|\bar{A})$ は良性細胞(非癌細胞)がカットオフ値より悪性側にある細胞の比率として、実際の計算にはニュージーランドのワイカト大学で開発されたデータマイニングツールであるWeka<sup>16)</sup>を用い、計算モデルにはBaysean networkを利用してナイーブベイズの計算をした。

倫理：この研究は新田塚医療福祉センターの倫理委

員会に承認されて行われた(承認番号 新倫 29-96号, 承認日平成30年1月9日)。

## 結 果

### I. 標本作製年度による染色性低下傾向の検討

2009年から2019年の標本のオレンジGの染色性は、予想されたように年とともに明らかな減衰傾向を示した(一元配置分散分析  $p<0.05$ ) (図1)。2019年の標本と各年次の標本をTukey-Kramerの多重比較で比べると2009年から2015年までの標本は有意に染色性が低下しており、今回の解析に用いた2017年の標本では有意差は認められなかった。

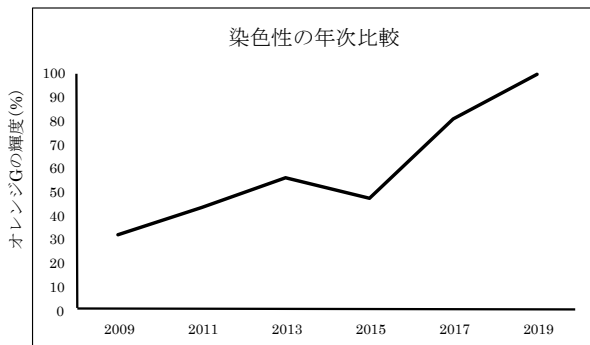


図1. オレンジGの染色性の年次比較

### II. 健常者の細胞と悪性例の細胞の比較

健常者の細胞 ( $n=85$ ) と悪性群の異常細胞 ( $n=85-90$ ) を比較すると有意に核面積は大きく、核の染色性はより濃く、オレンジG好性細胞質の輝度はより高く、細胞質

はより小さかった。核形不整に関しては真円度と凸度に有意差があり、円形度には有意差がなかった。少なくとも細胞変化のない正常細胞と比べて有意差がある項目が多く、良性病変の細胞と悪性細胞の鑑別に使える可能性があると考えられ、次の解析に進んだ。

### III. 良性病変の細胞と悪性例の細胞の比較

#### 1. 核の異常

良性群の細胞と悪性の個々の例の細胞の比較を行ったところ、核面積は悪性例1例で良性群より有意に大きく、3例では有意差が認められず、中央値は逆に小さかった(図2A)。良性群と悪性群の2群間には有意差がなかった。核の濃度は、悪性例3例で良性群より有意に高く、1例では有意差が認められなかった(図2B)。良性群と悪性群の2群間には有意差があった。

#### 2. 細胞質の異常

細胞質の面積は、個々の悪性例すべてで良性群より有意に小さかった(図3A)。細胞質のオレンジGの輝度は、悪性例3例で良性群より有意に高く、1例では有意差が認められなかった(図3B)。良性群と悪性群の2群間には有意差があった。

#### 3. N/C比

良性群と個々の悪性例のすべてでN/C比は良性群より有意に大きかった(図4)。良性群と悪性群の2群間の比較でも有意差があった。

#### 4. 核形不整

真円度、円形度に良性群と個々の悪性例のすべてに有意差がなかった(図5A, B)。凸度では、悪性例1例で良性細胞より有意に小さく、3例では有意差が認められな

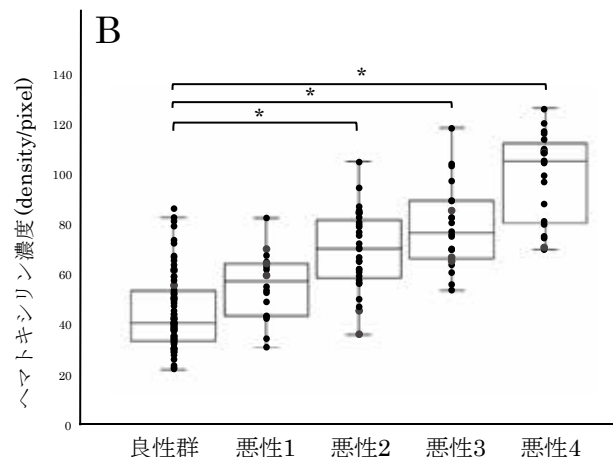
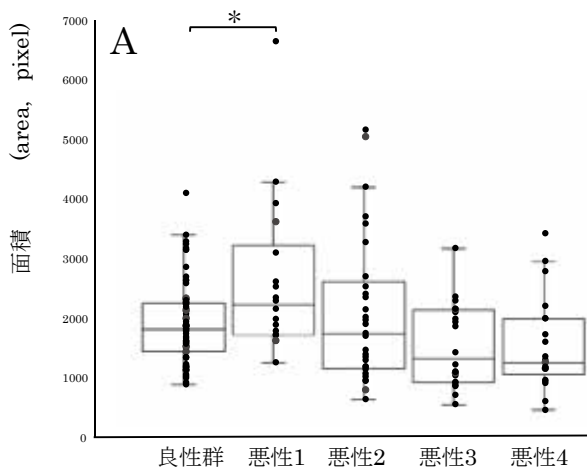


図2. 核の面積(A)と染色濃度(B)の比較。\* $p<0.05$

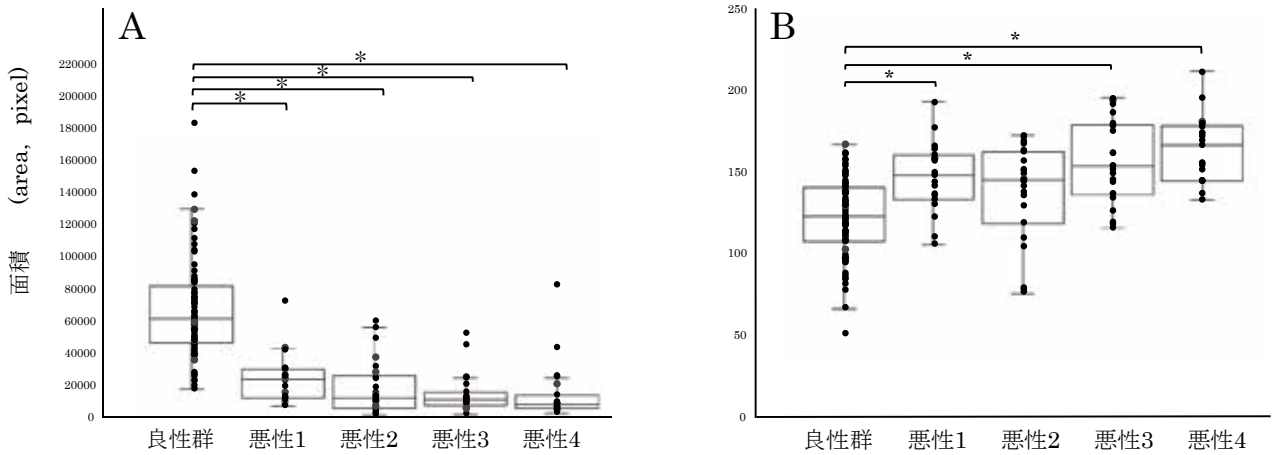


図3. 細胞質の面積(A)と輝度(B)の比較. \* $p < 0.05$

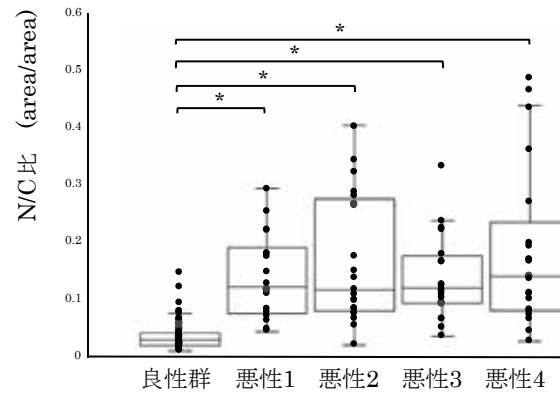


図4. 核・細胞質比(N/C比)の比較. \* $p < 0.05$

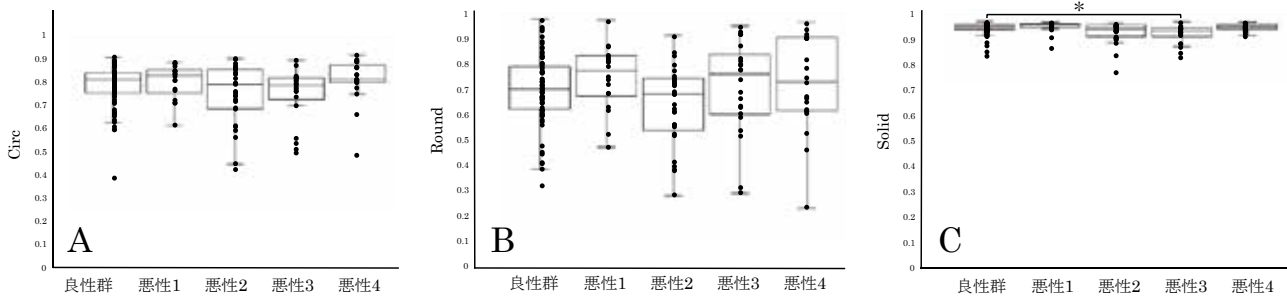


図5. 核形不整の比較. 真円度(circularity, A). 円形度(roundness, B). 凸度(solidity, C).  
それぞれの計算式は方法の項を参照. \* $p < 0.05$

かった(図5C). 良性群と悪性群の2群間でも有意差は認められなかった.

#### IV. 良悪の判定における各項目の有用性の統計的解析

ROC曲線(図6A-D)から算出されたAUCの値は, 細胞質の面積, N/C比, 核の濃度, 細胞質の輝度の順に大きく, それぞれの有意差を検討すると, 細胞の面積とN/C比間

には有意差が認められず細胞質の面積と核の濃度, 細胞質の輝度の間に有意差が認められた. 従って, N/C比と細胞質の面積が同等に良悪の判定に最も有用で, 次いで, 核の濃度と細胞質の輝度の順に有用と考えられた.

ROC曲線で得られた細胞質の面積, N/C比, 核の濃度, 細胞質の輝度におけるそれぞれのカットオフ値, 39010, 0.049, 53.010, 125.879を用いてBayesian networkで

事後確率を求めると、最も有用と考えられたN/C比と細胞の面積を単独で良悪の判定に用いた場合、それぞれの事後確率は $P=0.38$ ,  $P=0.40$ だったが、これらの2項目を共に用いると事後確率は $P=0.82$ まで高まり、さらにオレンジGの輝度を考慮に入れると $P=0.89$ になり、核の濃度を含めた4項目で見ると $P=0.97$ にまで高まった。4項目共にカットオフ値よりも悪性側にある細胞は良性例の全74個中細胞2個にみられたが、カットオフ値から大きく外れることはなかった。また、4項目ともにカットオフ値より良性側にある悪性例の細胞はなかった。

これらの解析で有用と考えられた4項目の値を用い、4項目共にカットオフ値から大きく離れ、顕微鏡下に容易に悪性と考えられる細胞群(図7A, B), カットオフ値が4項目共に大きいカットオフ値に近い、良性との鑑別が難しいが、やはり悪性と考えべき細胞群(図7C, D), カットオフ値が4項目共に小さいカットオフ値に近く悪性に近い形態の細胞だが、やはり良性を考えるべき細胞群(図7E, F)を客観的に抽出でき、細胞像を示した。

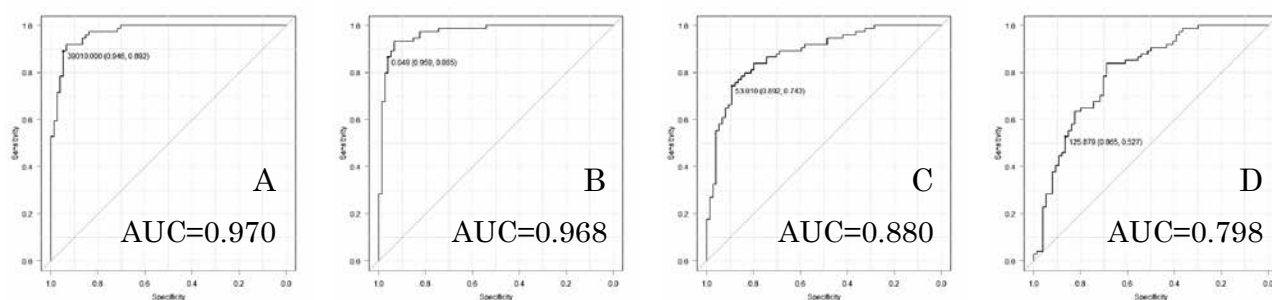


図6. ROC曲線. 細胞質の面積(A). N/C比(B). 核のヘマトキシリン濃度(C). 細胞質の輝度(D). AUCはarea under the curve曲線下面積. 左上の数字はカットオフ値(座標).

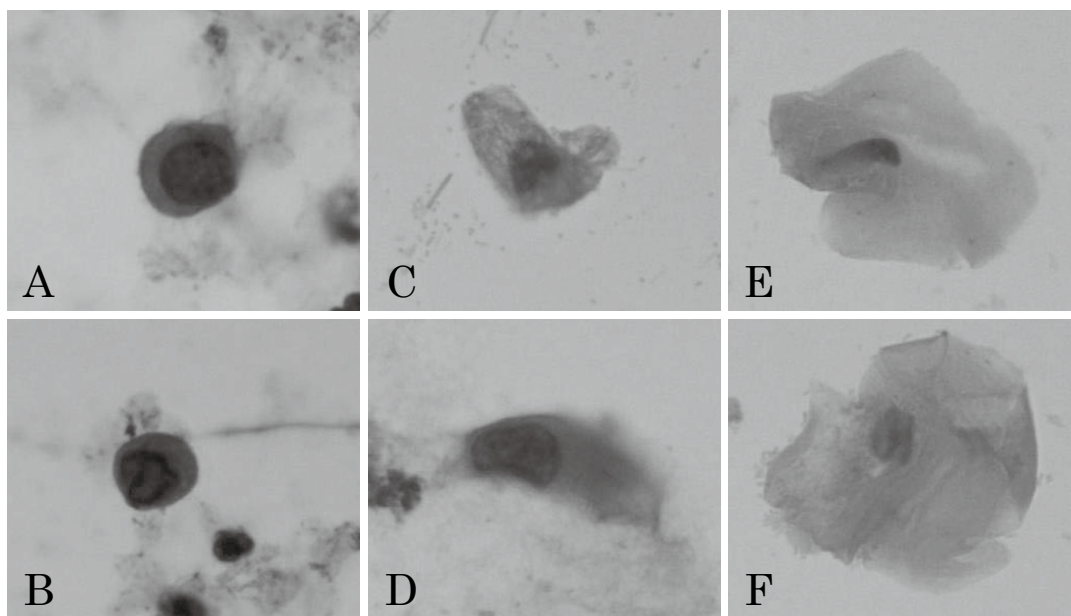


図7. カットオフ値による細胞比較. 明らかな悪性細胞(A, B). 悪性を考えるべき細胞(C, D). 良性を考えるべき細胞(E, F). (対物レンズ40倍, Papanicolaou染色)

## 考 察

悪性新生物の確定診断は病理診断でなされ、組織生検が広く行われているが、生検はその侵襲性のために患者の負担が大きい。また、局所麻酔や一般の手術に準じる周術期管理が必要であるので、患者の時間と費用がかさむことになる。これに対して擦過細胞診は手技が簡単で、非侵襲的な検査であるため患者の負担が小さい。体表に近いためにその利点が特に大きい口腔擦過細胞診は口腔がん検診や初診時のスクリーニング、口腔がん術後の長期経過観察におけるスクリーニングとして有用であると考えられる。他臓器と比較して、口腔がんは直接みて触れることができるため発見が容易であると考えられるが、口腔扁平上皮は炎症性刺激をうけやすい部位にあるために、早期の悪性病変との肉眼的鑑別が困難になることがある<sup>11)</sup>。高分化から超高分化な細胞のみからなることが多い<sup>4)</sup>口腔扁平上皮癌の特性から正診率が他臓器より低く、その正診率がしばしば問題になっている<sup>12)</sup>。早期発見、早期治療のためのスクリーニングとして正診率が若干低いことは、利点とのバランスを考えるとやむを得ないことではあるが、確定診断に伴う侵襲性やその他の観点から正診率を上げることには大きな意義がある。

口腔がんの擦過細胞診では深層型異型細胞が採取されにくいので、偽陰性につながる可能性があり、石橋ら<sup>11)</sup>は正診率を高めるためには深層細胞を採取することが重要だと述べている。我々も経験的には深層型異型細胞が採られてきた時の細胞診の判定は容易であると感じているが、日常経験する細胞診標本では表層の細胞だけが採られることは珍しくないため、今回は判定がより難しい表層のオレンジG好性細胞のみを対象として微細な形態の違いについて解析した。一般的な扁平上皮癌細胞の形態的特徴として N/C比の増大、核の腫大、核形不整、核クロマチンの増量、クロマチン構造の異常、細胞質の輝度の上昇などが挙げられる。細胞検査士はこのような形態の違いを顕微鏡的に観察し、経験的判断によって行っている。このプロセスは主観的な観察と思考過程であり、病理診断からのフィードバックによる自己学習等により判定結果が標準化されているが、施設間により違いがあるのが現状である。そのため、細胞形態を半定量から定量的に表現することで、検鏡者間の差異を是正する研究が報告されている<sup>13)</sup>。従来の学会発表される定量的研究の多くは核径や細胞径などの容易に測定できる項目

のみを解析し、後は半定量的に表現することが多かったが、今回の研究では多くの形態異常の因子を測定することができ、それらのうちから、細胞面積、N/C比、核のヘマトキシリン濃度、細胞質の輝度が良悪を分ける指標として用いることができることが定量的に明らかになった。

核の大きさは同じ扁平上皮癌である肺癌や子宮頸癌とともに口腔癌でも癌の判定に有用とされている<sup>17)</sup>。しかし、面積において、良性細胞と悪性の個々の例との間には1例に有意な差が認められたものの、ほかの3例には有意差がなかった。これは悪性を疑って細胞診がなされているので、良性の症例に核の大きさが増す再生性変化を示す細胞が多く含まれていたことに起因することが第一に考えられる。一方で、体腔液細胞診<sup>18)</sup>や乳腺細胞診領域<sup>19)</sup>で行われた細胞診の定量的測定で、核面積が有用であることが報告されている。この相違について、口腔癌では癌表層の分化傾向が著しいため、核の大きさに差がないことが多いと考えられ、また今回はオレンジG好性細胞という表面細胞を抽出したため有意な差が出なかったと考えられる。

癌細胞で細胞の大きさが小さくなることは、従来の判定基準にはなく<sup>17)</sup>、意外な結果だった。正常な重層扁平上皮は表層に向かって細胞が大きくなるが、癌では高分化癌でも正常な分化成熟がなされる前に分裂を繰り返すことにより小さくなると考えられた。一方、オレンジG好性細胞の細胞質の輝度に関して、肺扁平上皮癌でも口腔癌でも輝度が増加することがあることはよく知られている。しかし、肺癌では癌の判定におけるその重要性は以前より低下しており、どの程度判定に寄与するのかは明らかではなかったが、今回、3例の悪性症例で良性細胞と比較して細胞質の輝度は有意に高く、ROC曲線による解析でも4番目に有用な判定因子であることが明らかにされた。

核面積と細胞面積から算出したN/C比に関しては、悪性細胞の形態の基本的形態異常として重視されてきたが、今回の研究でも重要な判定因子と解析された。これらのことから、オレンジG好性の比較的面积が小さい細胞が標本中に認められた際は注意が必要であることが示唆された。

核形不整に関して、正常細胞と悪性細胞では真円度、凸度で有意差が認められ、悪性細胞では正常細胞に比べて核がより細長く、凹みが大きいことが示されたが、良

性群と悪性群では真円度，円形度，凸度のすべてで有意差が認められなかったことから良悪を判定するための因子としては用いられないことが示唆された．これは画像解析の過程において，閾値選択で核の領域を指定するのだが，繊細な核縁のラインをピクセル単位での指定が困難であったためかもしれない．一般的に核形不整は悪性細胞の判定に重要な因子と考えられているので，この指標に関しては今後より多くの画像解析を重ねることが必要であるとも考えられるが，Ambroise<sup>18)</sup>らは同じImageJを用いた体腔液細胞診の解析で核形不整の程度に差はなかったと報告しているので，口腔の高分化のがんでも核形不整が現れない可能性が高い．

個々の単一の因子による細胞を判定できる確率は低いが，因子を組み合わせることでその確率が上がったことから，所見を総合的にみて判断することが必要不可欠であることが分かった．また，カットオフ値よりも4項目共に悪性側にあった細胞の中で良性細胞は2個あったので，完璧ではないが，事後確率0.97と高い確率で悪性細胞を推定することができると考えられた．これにより，定量的な解析を行わなくても経験的にわかる明らかな癌細胞以外に，一般に判定が難しいとされる良悪境界領域の細胞に対して悪性を考える細胞と良性を考える細胞を区別することが可能となり，自己学習および教育的目的に利用可能と考えられた．

以上，ナイーブベイズにより信頼性の高い結果が得られたが，今回の研究では，染色性の減衰という問題のために比較的少数例の解析となったため，解析結果の精度を高めるためにより多くの症例の解析が待たれる．

## 結 語

口腔擦過細胞診において，細胞質の大きさとN/C比，核の濃度，細胞質の輝度の順に良悪を判定する因子として有用な所見であり，これらの形態異常を総合的に見ることによって，より確実な判定ができると結論された．

著者全員に本論文に関連し，開示すべきCOI状態にある企業，組織，団体はいずれも有りません．

## 文 献

- 1) 厚生労働統計協会．国民の動向 2019/2020．東京：厚生労働統計協会．421-422.
- 2) 国立がん研究センターがん情報サービス．東京：国立がん研究センター；2020 Apr 15. [http://www.ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](http://www.ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html).
- 3) 口腔癌診療ガイドライン改定委員会．口腔癌診療ガイドライン．2019年版．東京：金原出版；13-16.
- 4) Sloan P, Gale N, Hunter K. et al. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed.
- 5) Nair MK, Varghese C, Mathew B, et al. Prevention and early detection of oral, breast and cervical cancers:A practical approach in Indian context. J Indian Med Assoc. 1993 Apr ; 91(4): 94-96.
- 6) Mignogna MD, Fedele S, Oral cancer screening: 5 minutes to save a life. Lancet 2005 ; 365(9475): 1905-1906.
- 7) Drinnan AJ. Screening for oral cancer and precancer--a valuable new technique. Gen Dent 2000 ; 48(6): 656-660
- 8) Eesen D. The oral brush biopsy: a new reason to screen every patient for oral cancer. Gen Dent 2000 ; 48(1): 96-99.
- 9) 松坂賢一．口腔細胞診の現状．歯科学報 2017 ; 117(2): 87-92.
- 10) 奥田哲史，森敏雄，渡邊裕加ほか．口腔がん早期診断における細胞診の有用性の検討．滋賀県歯科医師会雑誌 2018 No.6.
- 11) 石橋浩晃，秀島克巳，関根浄治．細胞診による口腔がんの早期診断．口腔腫瘍 2013 ; 25(3): 54-71.
- 12) 吉田佳史，田中陽一，佐藤一道ほか．口腔扁平上皮癌の液状化検体細胞診に関する検討．J. Jpn. Soc. Clin. Cyto. 2013 ; 52(5): 399-405.
- 13) 二木由峰．画像解析装置を用いた口腔扁平上皮癌の細胞学的研究．日本口腔外科学 2002 ; 28 : 213-220.
- 14) National Institutes of Health(NIH) | Turning Discovery Into Health. アメリカ：アメリカ国立衛生研究所；2018. <http://www.nih.gov>.

- 15) 三浦耕太, 塚田祐基. ImageJではじめる生物画像解析. 第1版. 東京: 秀潤社; 2017. 103-104.
- 16) WEKAホームページ. ワイカト大学. ニュージーランド; 1997.  
<https://www.cs.waikato.ac.nz/~ml/weka/>.
- 17) 細胞診ガイドライン5 消化器 2015年版(日本臨床細胞学会編). 東京: 金原出版; 18-79.
- 18) Ambroise MM, Jothilingam P, Ramdas A. Utility of Nuclear Morphometry in Effusion Cytology. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(16): 6919-6922.
- 19) Narasimha A, Vasavi B, Kumar HM. Significance of nuclear morphometry in benign and malignant breast aspirates. Int J Appl Basic Med Res 2013; 3(1): 22-26.