

特集：腎病理の進歩

バーチャル顕微鏡の腎病理への応用

清水 章

はじめに

バーチャル顕微鏡は近年急速に普及し、利用方法や有用性が報告されている。教育や講習会での導入が始まり、遠隔地間でのコンサルテーション、共有した情報が必要なカンファランスや症例検討会でも用いられるようになり、今後も各方面での利用の拡大が予想される。バーチャル顕微鏡は、病理標本の顕微鏡画像の全面をデジタル撮影して電子化することによりコンピュータ(PC)上で観察を可能にしたデジタル化標本システムである。顕微鏡を使用しないこのシステムをバーチャル顕微鏡(virtual microscope)と呼び、取り込まれた画像はバーチャルスライド(virtual slide)といわれている。本稿では、組織標本のデジタル画像ということでバーチャルスライドという用語を使用する。

バーチャルスライドは早くから注目されていた技術ではあるが、取り扱うデータは膨大なメモリが必要な高解像度画像であり、精度や速度で実用に耐えられる装置の開発がきわめて難しかった。近年、デジタル CCD カメラの普及と PC 技術の発展で、ようやく大容量の画像データを PC 上で取り扱えるようになり実現に至っている。今後、PC 技術の発展に加え、情報処理や周辺機器の改良も加わり、さらに普及するものと考えられる。バーチャルスライドは、多くの人が同一の画像情報を同時に共有することが可能で、情報がデジタル化されていることから PC での管理ができ、ネットワークに接続することで多数の PC からのアクセスが可能で、また、各種の記憶媒体へのコピーも容易であることなどから、広い用途への応用が期待されている。腎臓病理の分野でも、バーチャルスライドは講習会、症例検討会や各種研究会で使用が始まっている。今後は、さらに腎病理の情報の整理、交換や蓄積、共有化、コンサルテ-

ションに威力を発揮し、腎病理組織診断の標準化の推進に大きく貢献するものと期待される。これらの観点から、腎臓病学領域へのバーチャル顕微鏡の応用について考察してみた。

バーチャル顕微鏡とバーチャルスライド

バーチャル(virtual)という用語は、“実物とは異なるが、本質、効果や役割は実物と同等であり、実世界を指向するもの”である。バーチャルリアリティが PC 技術によって仮想の世界を創り出すこととすると、バーチャル顕微鏡やバーチャルスライドは、PC 技術によって顕微鏡を使わずに顕微鏡がそこにあるかのように組織を観察できる仮想顕微鏡、もしくはその組織画像である仮想スライドということになる。このシステムは、顕微鏡組織標本の精細な画像を高性能の CCD カメラで撮影し、デジタル情報として PC に取り込み、モニタ上にこの組織標本の画像を描出し、専用のソフトウェアによってこの画像を自由に移動させたり拡大、縮小させたりして観察することが可能である。顕微鏡を使用せずに PC のモニタ上で顕微鏡に匹敵する組織像を観察できるため、このシステムをバーチャル顕微鏡、取り込まれたデジタル画像をバーチャルスライドと呼んでいる。顕微鏡の接眼レンズをのぞく代わりにモニタを用い、モニタに映し出される領域が視野となり、視野の移動を画面のスクロールで、対物レンズの切り替えをズーム機能を用いて行うことにより、バーチャルスライドは PC のモニタ上で、顕微鏡で実際にスライドグラス標本を観察するのと同様に組織像を見ることができる。

1. バーチャルスライドのシステム

バーチャルスライドは、1 枚の大きな顕微鏡画像であるが、そのシステム構成は画像取り込みユニットと観察ユニットから成る。画像取り込みユニットは光学顕微鏡(光頭)、試料スキャン装置、高性能 CCD カメラ、制御 PC お

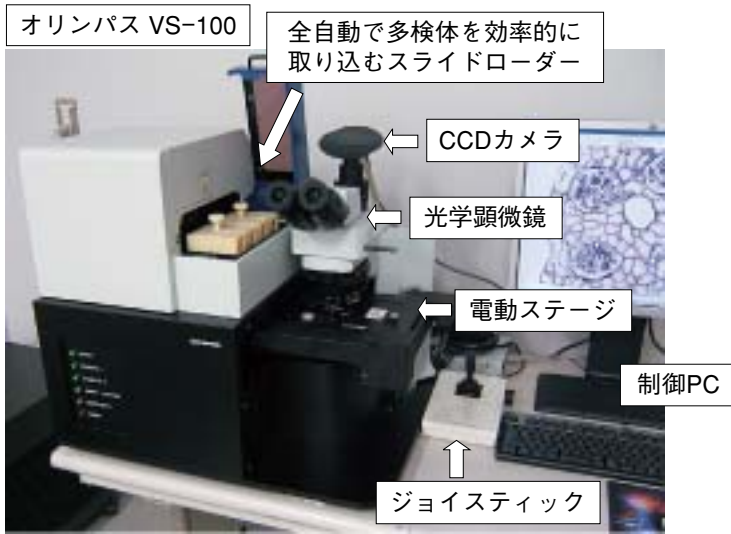
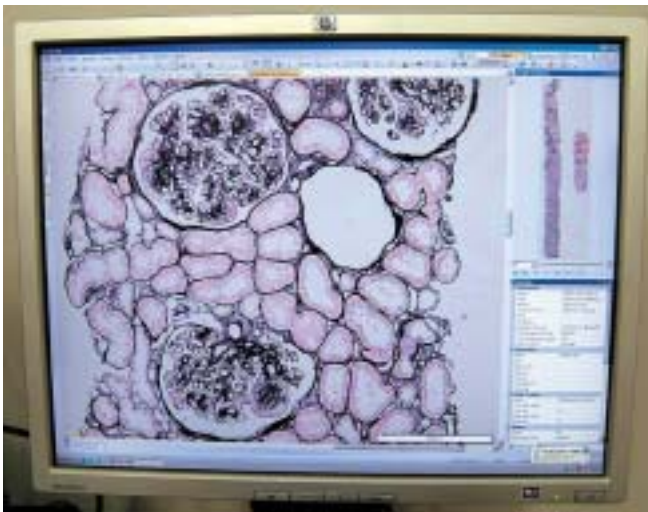


図 1 バーチャルスライドシステム

左側は自動焦点カメラ、電動ステージ、従来の顕微鏡を用いたバーチャルスライド撮影装置(オリンパス VS-100)で、モニタには撮影済みのデジタル画像の中拡大像が写っている。全自動で多くの検体を効率的に取り込むことが可能なスライドローダーの組み合わせも可能である。ジョイスティックは主に撮影時に用いる。

観察画面



分割して同調させた観察

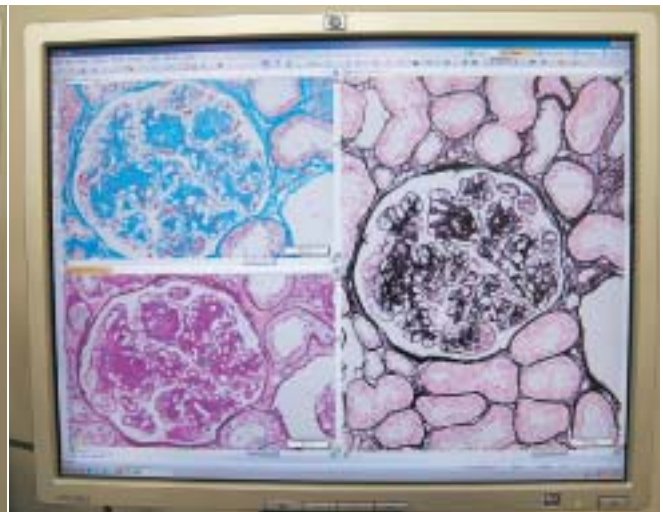


図 2 バーチャルスライドの観察画面と複数画像の同調観察

左側の観察時のモニタ画面では、画面右にルーベ像が呈示され、図ではわかりにくいですが、その組織内に小さな赤色の四角が見られる。この四角で囲まれた領域がモニタ上に描出されている病理像の部位で、全体像の中での位置を知ることができる。この四角をドラッグして画像を移動させることも可能である。このときの倍率は右中央部に示されている。この倍率も自由に変更が可能である。右下には画像の取り込み条件などが表示される。(図はモニタを直接デジタルカメラで撮影しているため、画質が実際より落ちている)

また、バーチャルスライドには、複数画像ファイルを同一画面で同調させて観察することができる(右側)。例えば、HE 染色と PAS 染色、Masson 染色、PAM 染色や、HE 染色と各種免疫染色標本を並べて一画面にしておけば、それらの観察部位や倍率を同調させて観察が可能である。同一切片ではないため同一場所とは言えないが、ほぼ近似した部位での比較観察が効率良く簡単に行える。このためにも薄切時に組織切片はスライドガラスの同一部位に同一方向に並べておくことが重要である。

よび画像取り込みソフトから構成され、腎生検の場合は主に 40 倍の対物レンズを使用して、試料をスキャンしながら、スライドガラス上の標本領域のすべてをデジタル画像として取り込み、PC 上に一つのスライドガラスの画像を作製する(図 1)。

画像取得の方法には、スライドガラスをフィルムスキャナなどでスキャンする方法、電動ステージで 1 コマずつ撮ってつなげるタイリング手法、電動ステージで 1 列ずつスキャンして撮ってつなげるストライピング手法があるが、いずれも、取り込む速さやピントを合わせるための工

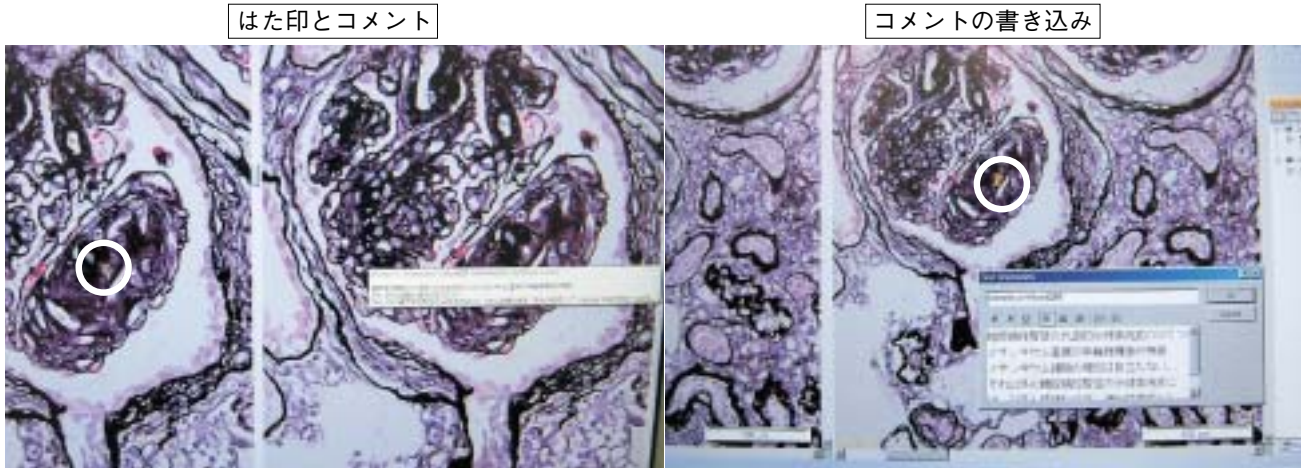


図 3 コメントの挿入

バーチャルスライドは、画像上にマークやコメントを残すことが可能である。図ではわかりにくいですが、図の白丸内にはた印が見られる。その部にカーソルを移動することによりコメントを確認したり(左側)、コメントの書き込みを行うことができる(右側)。この機能により、バーチャルスライド作成者の目的やねらい、教育であれば病理像のポイントをあらかじめ記載しておくことが可能であり、効率的にバーチャルスライドを使用することができる。また、バーチャルスライドから任意の拡大で画像を切り出し、静止画像を作成することも可能で、まとめや知識の整理にも有効である。(図はモニタを直接デジタルカメラで撮影しているため、画質が実際より落ちている。)

夫が施されている。自動連続画像取り込み装置も開発されており、スライドグラス標本をセットしておけば自動的に画像を取り込むことも可能である。

観察ユニットは、PCと観察専用ソフト(Viewerソフト)から構成される。観察者は自分のPCにインストールされたViewerソフトで、倍率や観察場所をマウスの操作で選択しながら、モニタ上で関心領域の顕微鏡画像を倍率を変えて観察するので、顕微鏡に標本をセットして観察しているのと同様の環境が提供される(図2)。Viewerソフトには便利な機能がついている。モニタ上でルーペ像を見ながら組織を自由な倍率で素早く観察ができ、同一検体で異なる染色や免疫染色など複数の染色標本を同一画面で同調させて観察も可能である。バーチャルスライド上にマークやコメントを付けることもでき、静止画像として簡単に任意の拡大で切り出すことも可能である。また、コンピュータ画像解析ソフトを用いた定量的解析への移行も簡単で、顕微鏡とは異なった方法での観察や解析を行うことが可能である(図2, 3)。Viewerソフトも今後ますます便利な機能を付加してくると思われる。

2. バーチャルスライドの有用性

バーチャルスライドの大きな有用性の一つは画像管理の容易さにある。バーチャルスライドは、アナログ情報である顕微鏡画像をデジタル情報に変換しているため、PC内蔵のハードディスク、外付けハードディスク、USBメモ

リー、CD-ROM、DVDなどの記録媒体に収納が可能で、PC上で画像を管理することができる。またサーバーに保存しておき、ネットワークを経由することにより、多数のPCからのアクセスが可能となる。インターネット上にサーバーをおくことにより遠隔地からのアクセスも可能となる。これにより、学生の教育や講習会などへの応用、外部からのコンサルテーションなど広い用途への応用が可能となる。標本の圧縮後のファイル容量は、40倍の対物レンズを用いた場合10mm×10mmの大きさの標本を取り込むと約1,080MBほどの大きさになる。腎生検組織は標本が小さいため、1本の組織片は300MB以内に収まることが多い。

3. バーチャルスライドと染色標本

現在、光顕で観察される各種染色標本や免疫染色標本がバーチャルスライドとして取り込まれる標本の主なものであるが、蛍光染色標本にも対応可能なバーチャルスライドシステムも実用化されている。蛍光標本は劣化しやすく保存もできないが、バーチャルスライドに取り込むことにより、取り込む手間はかかるものの、鮮明な画像として保存が可能となる。また、厚みのある標本に関しては、上下方向に焦点をずらして断層画像の取り込みが可能な機種もあり、三次元的な解析も可能となってきている。現在、組織標本の画像を取り込むためのバーチャルスライドシステムとして、オリンパス、浜松フォトニクス、クラーク、カー

表 バーチャルスライドの医学・医療への応用

1. 病理診断とその精度管理
日常の病理診断の報告, 病理診断の標準化・精度管理, 電子カルテへの組み入れ, データベース管理, コンサルテーション, 遠隔術中迅速病理診断, インフォームド・コンセント
2. カンファランス・講習会での活用
事前のデータの配布, グループカンファランス, 臨場感あふれる症例検討, 繰り返し学習, テレパソロジー, 遠隔カンファランス
3. 研究
病理像の蓄積とその活用, 画像解析による定量的解析, データベース管理, 共同研究者との検討, 遠隔カンファランス
4. 教育
病理学実習, 卒前・卒後教育, 繰り返し学習, 試験など
5. 出版物
実際的な組織病理学アトラスの作成, 医学雑誌や病理教科書などの充実した画像集や付録

ルツァイス, Aperio Technologies などの各社からそれぞれ独自の特徴をもった機種が発売されており, その特徴はインターネットでも知ることができる。

バーチャルスライドの医学・医療への応用

標本をデジタル化することの利点は想像を超えたものがある。バーチャルスライドの医学・医療への応用として, 1) 病理診断とその精度管理, 2) カンファランス・講習会への活用, 3) 研究, 4) 教育, 5) 実際的な組織病理学アトラスの作成などの出版物, などがあげられる(表)。

病理組織診断の電子化情報, テレパソロジーの応用分野の一つである遠隔迅速診断やコンサルテーションが可能にすることに加え, 病理標本のような褪色もなく, 標本管理がPC上ででき, 保管場所も縮小が可能で省スペース化が図られる。デジタル情報は簡単に複製でき, データベース管理や電子カルテとリンクさせることにより検索が短時間で可能となるなど数多くのメリットがある。

病理標本は顕微鏡を用いないと観察ができないが, バーチャルスライドはPCがあればいつでもどこでも見ることが可能で, 同一標本を多くの人が同時に観察できるという優れた特徴をもっている。現在, 多くの大学で病理組織学の実習に利用している。このシステムでは1枚の標本があれば実習が可能となるため, これまで実習への導入が困難であった腎生検組織標本などの小さい検体も実習を行うことが可能となった。良好なネットワーク環境が整っていればすぐにでも実施可能で, インターネットの環境下であ

ば繰り返して学習ができる。スライドカンファランスや症例検討会でも, バーチャルスライドをあらかじめ配布することで討論の質も得られ, 結論もはるかにレベルアップすることが期待される。また, 液晶プロジェクタを用いて投影されたバーチャルスライド画像は, あたかも顕微鏡観察を行っているような実感を会場全体で共有できる。

研究面においても, 光顕, 蛍光組織やFISHなどの蛍光標本の蓄積, データベース管理やテレパソロジーを用いた遠隔カンファランスも可能となる。従来の学術雑誌や病理学教科書の付録よりもはるかに豊かな内容の提供が可能であり, より充実した学術情報の提供, 組織病理学アトラスの作成, より学習効果の高い教材作成が期待できる。PC技術, 画像処理技術, 高速通信回線の普及など情報技術は急速に発展を続けている。今後, 更なる技術向上が望まれ, より使いやすく, 高速, 高精能, 多機能で安価なバーチャルスライドが開発されていくものと期待される。

バーチャルスライドの腎病理への応用と今後の展望

1. 腎病理診断標準化への活用

腎疾患の診断や病態の把握, 病期や予後の推定, 治療方針の決定には病理組織学的検討が不可欠である。腎組織診断は, 国際的に統一された組織診断となるようにWHO組織分類に従った診断法が普及しているが, 最近, ループス腎炎の改訂に向けて行われたConsensus会議(2002, New York), IgA腎症の臨床病理分類に関するWorking study(2005, Oxford)や腎移植病理のBanff会議(1991年より隔年で開催)など国際的なGlobal standardの見直しが行われている。わが国でも2005年に“腎生検病理診断標準化への指針”が発刊され, 用語の統一や組織診断手順の画一化が進められている¹⁾。今後も組織型ごとにEvidence Based Medicineに基づいた治療方針が決定される傾向にあり, 腎生検による組織診断の重要性はますます高まるものと思われる。

腎生検の診断では, 腎生検組織の標本のなかからできるだけ多くの情報を的確に抽出することが必要であり, 抽出した情報を系統立てて組み立てながら診断につなげる。病理診断の標準化のためには, 病理用語に対する共通認識, 共通した定義の使用と正確な理解はもちろんであるが, 各病理医により抽出された情報やその表現も共通している必要がある。各病理医がもつ情報の質, 量, 経験などからくる差が情報の系統的組み立ての過程に作用し, 結果として

診断に微妙なずれをもたらすこともある²⁾。この差をできる限り縮めることが診断の統一には重要な課題である。腎生検から得られた病理学的な情報は、診療に大きな影響を与えるため、標準化された共通判断による組織評価や診断が必須である。

このような理由により、腎生検病理診断の標準化が推進されている。同一の病変を同一のものとした共通認識を普遍的なものとし、腎病理診断の標準化をいっそう実用性の高いものとしていくことが重要で、この過程で多数の腎臓専門医の関与によるコンセンサスの確立が望まれる。この作業を効率的に進めるためにはバーチャルスライドが必要である³⁾。病理診断の標準化・精度管理にも有用で、同一の組織画像を多くの診断医に提供が可能なので、全国規模さらに国際的規模の精度管理が可能となる。診断医の講習会でのバーチャルスライドの利用のほかに、web 上でのコンセンサスカンファランスといった新しい講習会形式も可能となる⁴⁾。バーチャルスライドによる意見交換やコンセンサスを積み重ねていくことにより腎病理診断の標準化が進むことが期待される。

腎病理診断の標準化には、用語の統一や組織分類の統一、病変所見に対する基本的解釈の統一のほかに、標本の質の統一を図ることも重要である。情報源である標本の質が低ければ、そこから得られる情報も信頼度も限られたものとなり、最終的な診断に大きく影響する。バーチャルスライドを通じて他の施設の標本をみる機会が多くなれば、それぞれの施設で自己評価がなされ、標本の質についての標準化にもつながるはずである。

2008 年から、腎生検病理診断の標準化の普及のために行われている日本腎臓学会と日本腎病理学会の共催による夏の学校でもバーチャルスライドによる講習が行われるようになり効果を上げ始めている。また、毎年 1 月に行われている日本腎病理学会研究会でも共通病変に関する検討の際にはバーチャルスライドを用いている。腎病理を取り扱う各種カンファランスや研究会では、バーチャルスライドが配布され、またバーチャルスライドを用いた発表も多く、討論の際には会場でバーチャルスライドによる病変の確認も可能で、重要な情報が得られることも多い。

2. 腎臓分野への応用

バーチャルスライドは腎病理診断の標準化への活用ばかりではなく、腎臓分野における診断・教育・研究での活躍も期待される。腎生検診断に関しては、腎生検の臨床医への報告書も電子媒体による報告となり、加えてバーチャルスライドと閲覧 Viewer ソフトを一緒にメディアに保存し

て報告する方法が一般化しそうである。臨床医が PC 内で腎生検像を確認することが可能で、病態の理解と治療選択の助けとなり、インフォームド・コンセントにも役立つ。複数回の腎生検が行われ、前回の生検の問い合わせの際に標本の褪色が激しく使用に耐えられないという状況もなくなる。電子カルテへのリンクや、データベース化など PC による管理が可能となる。専門医へのコンサルテーションやセカンドオピニオンの取得も容易となる。実際、日本腎臓学会や日本病理学会が行っているコンサルテーションもバーチャルスライドによるコンサルテーションに変わりつつある。

腎生検は一般に光顕、免疫染色、電子顕微鏡(電顕)により診断される。光顕に加え、蛍光抗体法による免疫的機序の検索も診断に活用されている。抗糸球体基底膜腎炎や IgA 腎症など免疫的機序の関与する腎疾患では、確定診断のための重要な情報を提供している。また、疾患の病因に関わる免疫機序の推定にも用いられている。従来は蛍光抗体法の標本は長期の保存ができず、その観察は写真を撮影した条件によって蛍光高度が異なり、限られた範囲の画像から評価されることが多かった。現在では蛍光抗体法に対応したバーチャルスライドも実用化され、これらの問題が解決されつつある。また従来、電顕の電子画像はフィルムに照射し、現像と印画を行う必要があった。現在ではデジタル CCD カメラの進歩により、フィルムを用いずに電子画像をそのままデジタル画像として得ることが可能となり、時間的、経済的にも節約され、保管管理も容易になっている。電顕の観察も CCD カメラによる画像撮影が行われていることを考えると、バーチャルスライドの応用も可能と思われる。

研究においては、バーチャルスライドはアナログ情報からデジタル情報へ変換しているため、画像解析ソフトを用いて標本全体の定量的解析を一度に行うことが可能である。また、腎生検組織の観察は二次元情報に基づいて行われているが、腎組織像は三次元立体構築像で解析することでより詳細が明らかになることも多い^{5,6)}。バーチャルスライドはデジタル化された情報であり、一つの画面で画像を並べ比較することも可能で、連続切片による三次元的構築の検討を行う場合には非常に有用である。さらに重要なことは、各施設の腎生検標本をバーチャルスライド化し、全国規模でデータベースを構築することが可能になることである。ある腎疾患について個々の施設の腎生検組織標本を持ち寄って検討する場合には困難を伴うことも多いが、スライドグラス標本ではなくバーチャルスライドを集めて検

討することで解決できることも多いと思われる。スライドガラスの破損の危険も回避される。日本腎臓学会でも腎臓病総合レジストリー (Japanese renal biopsy registry : J-RBR/ Japan kidney disease registry : J-KDR) が構築されており、腎生検施行症例は腎生検症例登録 (J-RBR) に登録することになっている⁷⁾。すでに症例の登録が始まっているが、仮に、これらの情報に加えてバーチャルスライドの情報が蓄積されるようになると、莫大な情報がここから発信されていくと考えられる。厚生労働省研究費補助金、難治性疾患克服研究事業の進行性腎障害調査研究班 (主任研究者 松尾清一) 内に組織された腎病理分科会 (分担研究者 城謙輔) でも、IgA 腎症の病理像のバーチャルスライドを用いた診断や病変の抽出の標準化が進められている。腎病理の教育においても、バーチャルスライドは「医学・医療への応用」の項で述べたように、卒前教育、卒後教育、診断の精度管理や向上に応用が可能である。

3. バーチャルスライドの問題点

しかし、バーチャルスライドは長所ばかりではない。時間をかけてバーチャルスライドを作成する必要がある。腎生検組織は手術材料に比較して小さな組織であるが、40 倍の対物レンズを用いる場合には 1 個の組織を取り込むのに 10~20 分の時間が必要である。HE 染色、PAS 染色、Masson 染色、PAM 染色の 4 つの染色では約 1 時間必要で、1 枚のスライドガラスに載っている 3~4 個の組織をすべて取り込む場合には、さらに 3~4 倍の時間が必要になる。また、取り込まれた画像は情報量が大きく、1 症例でも CD-ROM では保存が不可能なことが多く、最低 DVD 程度の容量が必要になる。数多くの腎生検を行っている施設では、全例の腎生検の取り込みと、そのデータベース化には、更なるバーチャルスライド技術の向上が必要である。

また、情報の共有化を推進する際には、今後、慎重な配慮のもとにコンセンサスを確立していくべき大きな課題がある。バーチャルスライドシステムの普及と定着には、患者各位の個人情報の取り扱いと、情報提供施設のプライバシーを保護するためのバーチャルスライドの取り扱いについてのガイドラインの作成が必須である。デジタル情報が基本的にもっている情報の開放性が医療行為としての情報秘匿 (セキュリティ) とは相反していることが問題で、デジタル情報の利用方法、保存方法といった面や、病情報と臨床情報との接続や使用方法についてのガイドラインの作成とその厳守が必要である。情報提供施設のプライバシーの保護はバーチャルスライドシステムの普及と定着には欠かすことができない情報化における最低限のルール

であり慎重な対応が必要である。

前述の表に呈示したバーチャルスライドの医学・医療への応用のすべての項目が、腎臓分野においても応用が可能であり、バーチャルスライドの更なる機能向上と多施設への普及が、腎病理診断の標準化と腎臓病学の発展につながることは間違いない。

おわりに

腎組織診断には顕微鏡、蛍光抗体法、電顕がセットになって活用されており、それぞれの特異性を理解して、限られた検体から最大限の情報を引き出し、正確に診断し、疾患の活動性や病期を正確に把握し、治療方針の決定や予後の推定に反映させることが重要である。現在では、顕微鏡、蛍光抗体法に対してバーチャルスライドが活用されている。電顕による観察も CCD カメラによる画像の撮影が行われていることを考えると、バーチャルスライド化が可能と思われる。腎生検情報のすべてがバーチャルスライドにより効率的に管理される日も近いと思われる。今後、バーチャルスライドは機能も精度も、格段に進歩することは疑いのないことである。バーチャルスライドがますます日常的となり、組織のスライドガラスを保存しなくても顕微鏡画像ファイルで保管し、画像の検索も短時間で行うことが可能となり、精度管理やデータベース化も進むと思われる。バーチャルスライドを用いた腎病理組織像の共有が腎病理診断のレベルの更なる向上につながり、ひいては診療の最適化と標準化に大きく寄与するものと期待している。

文 献

1. 日本腎臓学会・腎病理診断標準化委員会 (編). 腎生検病理診断標準化への指針. 東京: 東京医学社, 2005.
2. 杉崎祐一, 清水 章. 日本の腎病理医に内在する問題点: 腎病理診断向上のために. 医学のあゆみ 2006; 219: 555-559.
3. 山中宣昭. バーチャル顕微鏡に期待するもの. 医学のあゆみ 2006; 219: 593-596.
4. 佐々木功典, 小賀厚徳, 河内茂人, 古屋智子, 帖地康代. web site 上での virtual slide. 病理と臨床 2006; 24: 379-386.
5. 山中宣昭. 糖尿病性糸球体硬化症とその進展. 腎と透析 2001; 51 臨時増刊号: 209-216.
6. 北村博司, 三瀬直文, 温 敏, 山中宣昭. 糸球体門部小血管増生. 腎と透析 2001; 臨時増刊号 51: 228-232.
7. 日本腎臓学会ホームページ: 腎臓研究登録, 腎臓病総合レジストリー. <http://www.jsn.or.jp/member/registry/registry.php>