

(様式3号)

学位論文の要旨

氏名 佐藤 正一

【題名】

自己分配方式による新クラスター分析法の考案とその白血球自動分類への応用

【要旨】

背景: クラスター分析は類似性をもったデータを自動的に分別する手法である。その臨床検査領域への応用として、血液自動分析装置から出力される白血球の2次元散布データから、各分画の割合を求めるのがテーマである。しかし、従来のクラスター分析法では、分画(クラスター)の誤認が生じ、実用化に至っていない。そこで、本研究では、それらの課題に対応した新しいクラスター分析法を独自に開発し、その有用性を評価した。

方法: 白血球分画誤認の原因は、分画間の重なりやノイズ粒子の存在が原因と考えられる。そこで新法では、①画像処理の技術で各分画の中央を的確に検出、②分画境界部の重なりを自己分配方式という新しい概念で判定、かつ③反復切断補正法を使ってノイズの影響を最小限に抑える、という3つの工夫を行った。比較対象法は、K-mean法、EMアルゴリズムとした。性能評価のため、乱数により白血球分画の疑似データを発生し、各分画の広がりやデータ数、分画相互の重なり、ノイズ率を様々に変化させて検討した。また、実臨床データによる検証として、堀場製作所の自動血球分析装置で計測された患者データを使って分析を行い、装置分類や目視分類の結果と比較した。

結果: K-Mean法は、適切は初期分画の数と位置に依存し、かつ分画境界部の処理を的確に行えず、疑似データの段階で適用不可と判断された。EMアルゴリズムでは、分画部の自然な重なりを適切に判定できたが、初期値の数と位置に依存した。またノイズデータの存在で不要な分画を検出し、データ数大の分画では、過剰な分画化を起す傾向があるため、実臨床への応用は困難と判断された。一方、新法は、画像処理技術で分画の初期位置を的確に推定でき、かつノイズデータにも影響されないため、架空の分画を検出することはなかった。患者データによる検討では、目視分類と一致が得られ、白血球増多症に対しては、装置分類よりも的確な結果が得られることが確認された。

考察: 本法は、分画の重なりを新規な自己分配方式で的確に制御でき、かつ反復切断補正法でノイズに対応できるため、多種多様な臨床病態において白血球自動分類を的確に行えることが確認された。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1458 号	氏 名	佐藤 正一
論文審査担当者	主査教授	野島 順三	
	副査教授	岡野 こずえ	
	副査教授	市原 清志	
学位論文題目名			
自己分配方式による新クラスター分析法の考案とその白血球自動分類への応用			
学位論文の関連論文題目名			
A new self-partition clustering method for robust identification of subsets with heterogeneous size and density and its clinical application to leukocyte differential counting.			
(多様なクラスターの形状に頑強に対応可能な自己分配方式による、新クラスター分析法の考案とその白血球自動分類への応用)			
掲載雑誌名 Clinica Chimica Acta (2016): in press doi:10.1016/j.cca.2016.01.018			
著者名 Shouich Sato, Kiyoshi Ichihara, and Tohru Inaba			
【 論文審査の要旨 】			
<p>学位論文審査会では、白血球自動分類の仕組みと従来のクラスター分析の原理と課題が示され、佐藤正一氏の考案した新法の原理とその有用性の検証結果が発表された。学術発表に関し十分な経験を有し、よく工夫されたスライドで、わかりやすい内容であった。</p> <p>発表後の質疑応答は次の通りである。</p>			
<p>1. <u>形態学的な検査では、血液塗抹標本を観察して、わずかなパーセントの異形細胞を検出することも重要と考えられるが、限界はどの程度か？</u></p> <p>返答: 今回の検討は、機器分析の限界を補完する手法として検討しているものであり、出現比率の少ない細胞に関しては、ノイズとして扱われるため、比率が低いと検出できない。いずれにしても、データバランスが異常の場合は、目視による確認が必要という警報を出す必要がある。</p>			
<p>2. <u>異常に対して警報を出すことがより有用であるが、桿状核球が増えている場合を判定できるのか？</u></p> <p>返答: 炎症反応に関しては、好中球の幼弱細胞の出現によってクラスターの計数(重心)の変化があるため、炎症反応を判断できる可能性はある。今後、経時的変化に対するデータを集めて検討し、計数の有効利用を検討する予定である。</p>			
<p>3. <u>フローサイトメトリーにも応用できるか？また主要なメーカーの装置にも応用できるか？</u></p> <p>返答: 今回のデータは、堀場制作所の分析装置に特化して検討したが、別にシスメックス社のものでも検討し同等の結果を得ている。ただし、同社では3次元の情報から分画化する機能を導入しており、私の方法に依存する必要はないかもしれない。フローサイトメトリーへの応用は、問題ないと考えている。</p>			
<p>4. <u>普通の測定法ではどの程度問題のあるデータが出現しているのか？</u></p> <p>返答: 健常人であっても数パーセントは不一致例がでる場合がある。機器分析結果とSPC/ITC結果の比較をすることで、特殊なパターンを分類し、診断補助情報として提供できる可能性がある。</p>			
<p>5. <u>イメージプロセッシング方式クラスター探索法は自動で行えるのか？</u></p> <p>返答: すべて自動で、クラスター初期位置候補を見いだせる。</p>			

発表後の個別審査会の質疑応答は次の通りである。

1. 異常細胞への対応に関して、異常細胞が多数出てきている場合に、白血球5分類以外のクラスターとして検出可能か？（例えば異型リンパ球や病的細胞など）

返答: イメージ プロセッシング方式クラスター探索法によって、多めにクラスターを検出するようにしておけば、自己分配方式クラスター分析法/ 二次元反復切断補正法 (SPC/ITC) によってクラスター化は可能である。出現位置についても、このクラスター分析法は細胞の位置には関係なくクラスターとして追跡するため、問題なく検出可能である。ただし、異常細胞を捉えるには機器側の性能による部分があり、クラスターとして捉えられる分解能が必要であることや、細胞数が 8000 細胞中百以上は必要と考えられる。實際上、数十の細胞数しかない場合には、その検出は困難である。

2. 論文の改訂場所に関して

返答: 前回提出論文からの見直し点は、文章の全体の構成を見直して文章の流れを作り替え、誤字脱字の訂正を実施した。追加修正した部分は、12 頁の 2-4-3 最大距離アルゴリズムにおいて説明文および図に関して大幅な修正を行った。最終論文に対しては、再度細部の見直しと修正を行う。

3. 単球が目視法に対して相関性が悪い理由は？

返答: 単球比率が目視法のそれと相関が悪いのは、目視法による計測自体の問題点と考えられる。ウェッジ法による血液塗抹標本作成では、標本周囲に好中球が多くなり、引き終わり単球などの大型細胞が固まり標本上の不均一がある。このような状況での目視法のデータは、目視する部位によって大きな個人差が発生しやすい状況にある。また、目視法の計測細胞数は 200 カウントまたは 400 カウントであり、単球のような 5%程度しか検出されない細胞では大きな誤差が発生することも相関性の悪さにつながっている。

今回、目視法との関係性を提示したが、目視法自体に問題点があるため議論を進めることは難しい。少数細胞においては、多くの細胞について計測する機器分析の方が優れていると考えられる。

4. 好塩基球の計測はどうなっているのか？

返答: 堀場製作所の Pentra MS CRP は、好塩基球を除く白血球の散布図を示しており、今回の検討では 4 分類についての検討である。多くの分析機器は、好塩基球は細胞数が少ないために別チャンネルを設けて計測している。シスメックス社の機器では、別チャンネルで計測したデータを 2 次元散布図に表示する機能で見ることが出来るようになっている。

5. 一般的なフローサイトメトリーへの対応は可能か？

返答: フローサイトメトリーに対しても、全く同様のアルゴリズムを適応可能と考えれ、現状の手動でゲートを設定して分画化する過程を自動化できると考えている。

6. 分葉核球と桿状核球の分類は可能か？

返答: 現時点で分葉核球と桿状核球を区別することは不可能である。ただし、幼弱細胞が出るような場合には、クラスター形成される位置が変化するため、位置情報の変化を捉えて幼弱な細胞が出ていることに警告を出すことは可能である。なお敗血症では、時系列的に見ると好酸球%の減少と単球%の減少が認められ、単球は出現位置も変化する傾向にあるため、今後の研究課題としたい。

7. 発表においては血液細胞分析の適応例について述べているが、論文では広く一般化した内容まで触れていたが、一般化に関してはどうなのか？

返答: 自己分配という考え方は、血球の自動分類に限定されるものではなく、自己免疫疾患などの互いにオーバーラップした特異疾患群の分類にも適用可能である。自己分配方式の威力は、各症例が分離された個々の自己免疫疾患の要素をどの程度併せ持っているかを、“自己分配係数” から推定でき点である。また糖尿病の合併症の分類に応用すれば、個々の患者の合併症の複合状態を推測することも可能と考えている。

その他（論文体裁）についての指摘

1. 字体にバラツキが認められる。
明朝体に統一します。
2. 26 頁の式番号が 2 重になっている。
修正します。

最終論文の修正

- 1) 図 2-7 をよりわかりやすい説明図に変更
- 2) 図 3-5 に ITC 法の解説を追加
- 3) 図 3-6 を白血球分類データに変更する
- 4) 図 4-9 に 8000 カウントの信頼区間を追加する
- 5) その他不適切な表現を修正

【最終試験の結果の要旨】

血球自動分析装置から出力される白血球成分の 2 次元散布図から、白血球の分画化を自動的に行うことは、クラスター分析の格好の応用対象と思われるが、実用化には至っていない。これは、様々な病態で生じる白血球分画間の重なりや細胞破片や凝集によるノイズへの対応が困難なためと思われる。佐藤正一氏の開発した新法（SPC/ITC 法）は、3 つのアルゴリズム、すなわち(1) 画像処理によるクラスター初期位置の的確な推定、(2) 2 次元反復切断補正法によるノイズ対応、(3) 新規な自己分配方式（個々の細胞の各クラスターへの帰属確率に基づいてクラスターの重心や広がり进行调整）によるクラスターの重なりへの柔軟な対応により、従来法の課題の克服を狙ったものである。佐藤氏は、SPC/ITC 法の特性を、乱数発生した各種のモデルデータを用いて検証し、従来の代表的なクラスター分析法である K-mean 法や EM 法と比べて、期待通りの優れた特性を有することを実証した。続いて臨床応用として、白血球分類における性能を、多数の健常者および患者の試料について、自動分析装置による分類および目視法や EM 法による分類と比較した。その結果、総合的にどの方法と比べても、よりの的確な分類が可能であることを実証した。

この研究成果は、極めて画期的なものといえる。實際上、研究の方法論の新規性およびそれを科学的に実証する過程が的確であり、この研究内容は博士論文に十分値するものと評価できる。また、学術発表にも十分な経験を持ち、審査会での発表並びに、質疑への応答も極めて適確であった。よって、佐藤正一氏は、保健学博士にふさわしい成果を達成したと判断した。