

人工知能アルゴリズムを用いた
食道癌患者における血中循環腫瘍細胞の検出

The use of artificial intelligence algorithm in detection of
circulating tumor cells in esophageal cancer patients

医学薬学教育部博士課程(医学系) 生命・臨床医学専攻

明石 堯久

目次

要旨	3
1. 序論.....	5
2. 材料と方法.....	6
2.1 ヒト食道扁平上皮癌細胞株と細胞培養	6
2.2 CTC 濃縮	6
2.3 免疫染色.....	6
2.4 画像処理と加工.....	7
2.5 ヒト食道癌細胞株の識別	7
2.6 細胞検出力の比較.....	8
2.7 画像識別精度の比較.....	8
2.8 患者検体.....	8
2.9 統計解析	8
3. 結果.....	9
3.1 AI による細胞株識別精度の検証.....	9
3.2 AI と外科医の細胞検出力の比較.....	11
3.3 AI と外科医の画像識別精度の比較	12
3.4 臨床検体を用いた検討	13
4. 考察	15
5. 結語	17
6. 謝辞	17
7. 参考文献	18

要旨

目的

近年、食道扁平上皮癌 (ESCC) に対する集学的治療の進歩にも関わらず、治療後に再発や遠隔転移をきたし、その治療成績は不良である。様々な癌腫において、血中循環腫瘍細胞 (CTC) は原発巣の細胞生物学的特徴を反映しており遠隔転移と密接に関連していることが明らかになってきている。食道癌において、CTC は遠隔転移だけでなく治療効果や予後の予測因子としても考えられている。しかし、CTC は複数のマーカーを発現していることから、細胞病理学的な不均一性を持ち、その検出は複雑で時間を要するものとなっている。本研究では、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いた人工知能 (AI) アルゴリズムを構築し、ESCC細胞株および臨床検体を用いて短時間で施行可能なCTC検出法を確立する。

方法および結果

AIによるESCC細胞と健常人血液細胞の画像識別精度を比較するために、ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (KYSE30、KYSE140、KYSE520、KYSE1440) と健常人ボランティアの末梢血単核細胞を用いて、細胞核をDAPIで染色を行い、細胞接着分子であり上皮特異的細胞表面マーカーとなるEpCAM (epithelial cell adhesion molecule) 染色を行った画像を用いて評価を行った。1種類のKYSEと健常人血液細胞の画像でAIに事前学習を行った後に、KYSE株4種類および健常人血液細胞の画像を評価させた。事前学習と同種の細胞を用いた場合ではKYSE30 : 99.9%、KYSE140 : 99.8%、KYSE520 : 99.8%、KYSE1440 : 100%の精度で細胞画像を識別した。事前学習に用いた細胞株と別種の細胞株の画像を用いた評価でも、いずれの組み合わせにおいても細胞株と健常人血液細胞を識別する特異度は99.6%以上であった。一方で、感度は20.4%~100%と幅があり、事前学習で用いた細胞株と評価する細胞株の組み合わせに依存する結果となった。KYSE30とKYSE520ではEpCAMの発現に著しい違いがあるにもかかわらず、KYSE30は99.8%の精度で健常人血液細胞と識別され、逆にKYSE520は99.8%の精度で健常人血液細胞と識別された。これはEpCAMとDAPI以外の未知の要素で細胞の識別を行っていることが示唆された。

次にAIと人間の細胞検出力を比較するため、KYSE140と健常人血液細胞のDAPI染色画像3枚をAIおよび3人に外科医に提供して、細胞株として認識するDAPI陽性領域の数とその解析に要する時間の比較を行った。KYSE140の画像の場合、AIが平均 1335.3 ± 168.6 個、外科医が平均 1246.1 ± 113.0 個の細胞を検出したが、統計学的有意差は認めなかった ($p=0.71$)。健常人血液細胞の画像を用いた場合、AIは平均 425.6 ± 29.1 個、外科医は平均 387.7 ± 45.6 個の細胞を検出したが、こちらも統計学的有意差は認められな

った ($p=0.58$)。一方で解析時間は、KYSE140の場合、AIは 4.9 ± 0.3 秒、外科医は 591.4 ± 62.4 秒であり、統計学的有意差を認めた ($p=0.016$)。健常人血液細胞の場合、AIは 4.9 ± 0.3 秒、外科医は 243.3 ± 18.8 秒であり、こちらも統計学的有意差を認めた ($p=0.016$)。これらの結果より、AIと人間の細胞検出精度が同等かつAIは短時間での解析が可能であることが示された。

さらに、AIと外科医の画像識別精度を比較するため、DAPIおよびEpCAMで染色を行ったKYSE140と健常人血液細胞で事前学習を行ったAIと4人の外科医が、計100枚 (KYSE140 50枚、健常人血液細胞 50枚) の画像セットを3セット用いて画像評価を行った。AIの平均精度は100%、外科医の平均精度は91.8%であり統計学的有意差を認めた ($p=0.011$)。画像解析に要した時間はAIが平均0.7秒、外科医が平均630.4秒であり、こちらも統計学的有意差を認めた ($p=0.012$)。

当院で2022年1月から10月の間に治療を行った食道扁平上皮癌患者10名と健常人ボランティア5名の血液検体を用いて、アルゴリズムで処理を行った画像から検出されたCTC候補細胞の平均数は患者群で平均 44.5 ± 20.9 個、健常人ボランティア群で 2.4 ± 0.8 個と患者群で有意に多かった ($p=0.019$)。これは過去に報告されている数と同等であった。

総括

今回、新たに構築したCNNベースのAIアルゴリズムは、人間と比較して短時間で解析を行い、高い精度で食道癌細胞と健常人末梢血細胞の識別に有用であった。

1. 序論

高齢化に伴い、癌は死因の上位を占めている。食道癌は 2020 年には世界で 50 万人以上が死亡する第 6 位の癌腫である (1)。近年、食道癌に対する集学的治療が進歩しているが、多くの患者が遠隔転移や手術後の再発で死亡している (2)。血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells:CTC) は原発巣から血流に侵入した癌細胞と定義され (3)、癌の遠隔転移や再発の予測因子と考えられている (4,5)。食道癌では CTC の検出が病期の進行、治療抵抗性や予後と関連することが報告されている (6,7)。

CTC 分離法の多くは、CTC 濃縮と検出という 2 段階のプロセスで構成されている。CTC 濃縮は、細胞表面マーカーの発現や形態学的特徴に基づくものが一般的であり、種々の免疫学的手法、マイクロ流体デバイス、または密度勾配遠心法を用いて CTC を分離する (6-9)。一方、CTC の検出方法には顕微鏡による肉眼観察、免疫染色、フローサイトメトリー、生体力学的識別や PCR などがある (7, 10, 11)。しかし、最も一般的な手法は、細胞表面マーカーで染色された細胞を顕微鏡下に肉眼で検出することである。

近年、癌細胞の悪性度、幹細胞としての性質、細胞表面マーカー発現などの不均一性についての報告から、CTC における細胞病理学的不均一性や悪性細胞サブセットの同定に注目が集まっている (4, 12-16)。その結果、CTC の検出は複数のマーカーを用いた検出が必要となり、より複雑で時間を要するものとなっている。そのため、臨床応用には簡便かつ短時間で施行可能な検出方法が必要である。

人間の知的能力の一部をコンピュータに実行させるプログラムを人工知能 (artificial intelligence:AI) と呼ぶ。AI は多種多様なデータから重要情報のみを抽出する、あるいは共通するパターンを分類しまとめることで、人間の作業の一部を肩代わりすることが可能である (17, 18)。近年、Deep learning と呼ばれる人間の脳皮質をモデルにした、階層構造を用いて学習する手法が注目されている (19)。特に、Deep learning の一つである畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network:CNN) を用いた物体認識は画像診断支援技術に応用されている (20)。今回構築したアルゴリズムは、撮影した顕微鏡画像から条件設定に従って細胞領域を切り出し、蛍光細胞画像を得る。この画像を CNN に入力することで、自動的に特徴量が抽出される。これを繰り返し、最終的に抽出された特徴量を基準に出力を行う。Figure1 に今回構築した CNN をベースとした AI アルゴリズムの模式図を示す。

本研究の目的は、食道癌の CTC 検出において、畳み込みニューラルネットワークを用いた画像処理アルゴリズムを新たに構築することで、短時間で施行可能な CTC 検出方法を確立することである。

本学位論文は学術雑誌「Oncology Letters」に投稿中の原著論文 (21) を基礎として作成された。

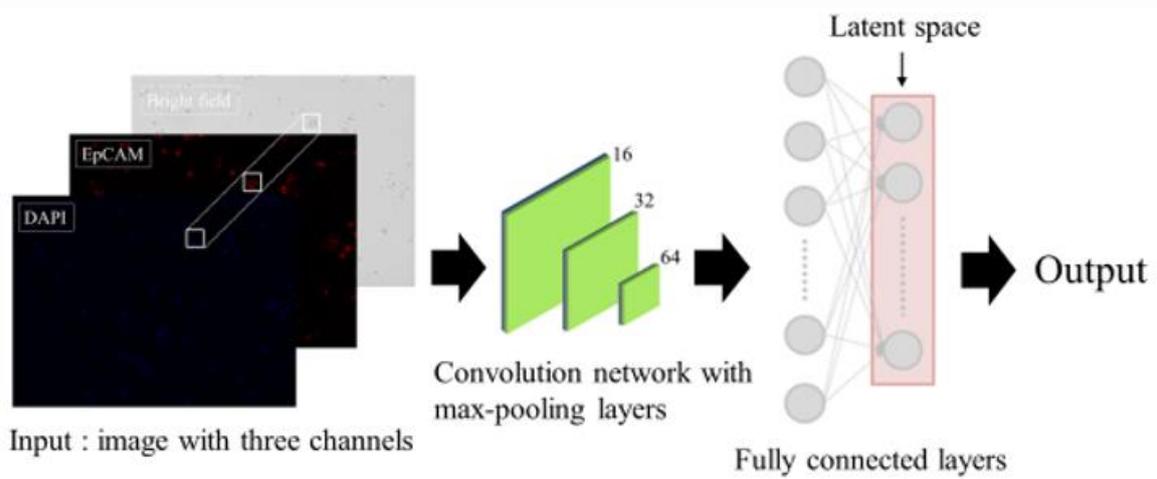


Figure1:使用した CNN の模式図.

2. 材料と方法

2.1 ヒト食道扁平上皮癌細胞株と細胞培養

ヒト食道扁平上皮癌 (esophageal squamous cell carcinoma:ESCC) 細胞株 (KYSE30、KYSE140、KYSE520、KYSE1440) は、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (Tokyo, Japan) より購入した。購入した細胞株は、JCRB の STR プロファイリングを用いて認証されている。細胞は 1% penicillin-streptomycin および 10 % fetal calf serum (FCS) を添加した DMEM 培地 (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 内で 37°C、5%CO₂ 下で細胞培養皿を用いて培養した。培養細胞をカルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で洗浄した後、Trypsin-EDTA (0.25%) (ThermoFisher, Massachusetts, USA) を用いて培養皿から剥がした。

2.2 健常人血液細胞および CTC 濃縮

健常人ボランティアまたは ESCC 患者から 2.5mL の末梢血液を EDTA チューブに採取した。採取した血液は、RosetteSep™ Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail (StemCell™ Technologies, Vancouver, Canada) と Lymphoprep™ (StemCell™ Technology, Vancouver, Canada) を組み合わせた密度勾配遠心法により CTC の分離を行った。

250 μ L (50 μ L/mL) の RosetteSep™ Cocktail を 2.5 mL の血液に添加し、室温で 20 分間インキュベートして CD45 depletion を行った (22-26)。その後、等倍量の PBS で希釈し、Lymphoprep™ の上層に注意深く重ね、3,600rpm、室温で 20 分間遠心分離した (27-31)。遠心分離後、上清を別の 15 mL チューブに移した。その後、1800rpm、室温、20 分間で再度遠心分離し、細胞をペレット化した。ペレット化した細胞を回収し、残存した赤血球を BD Pharm Lyse lysing solution (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) により溶血処理を行い、PBS で洗浄した。

2.3 免疫染色

細胞固定は 4% パラホルムアルデヒドを用いて行った。細胞膜の染色には、human monoclonal EpCAM-phycoerythrin (PE) (clone REA764; MACS Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) antibodies を使用した。抗体は 5% FBS を含む 50 μ l の PBS で 1 : 50 に希釈して使用した。抗体添加後 60 分で、細胞を PBS で洗浄し、1200rpm、4°C、5 分間遠心してペレット化した。細胞核の染色のために SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher, Massachusetts, USA) を加え、スライドガラスに滴下し、15×15 mm カバーガラスで封入して、観察用スライドを作成した。

2.4 画像処理と加工

作成したスライドを倒立顕微鏡 BZ-X800 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて画像取得を行った。画像撮影の際には対物レンズを 20 倍の倍率とした。取得した画像は富山大学工学部 機械知能システム工学科 機械情報計測研究室の協力を得て構築したアルゴリズムを用いて処理した。

取得した画像は次に示す形態学的基準で細胞画像の加工を行った。まず、大津法による DAPI 陽性領域を決定した(32)。さらに、EpCAM の輝度が 20 以上の DAPI 陽性領域を絞り込んだ。最後に 700 画素以上の面積の DAPI 陽性または EpCAM 陽性の領域を除外した。最後に残った領域を 1 個ずつの細胞画像に加工した。

2.5 ヒト食道扁平上皮癌細胞株の識別

AI による食道癌細胞と健常人血液細胞の画像識別精度を検証するため、DAPI および EpCAM で染色した ESCC 細胞株 (KYSE30 : 640 枚、KYSE140 : 194 枚、KYSE520 : 1037 枚、KYSE1440 : 347 枚) と健常人血液細胞 (400 枚) の画像を用いて、1 組ずつ順番に (KYSE30 と健常人血液細胞、KYSE140 と健常人血液細胞、KYSE520 と健常人血液細胞、KYSE1440 と健常人血液細胞) で AI に事前学習を行った。

次に答えを隠した状態で食道癌細胞株 1 種と常人血液細胞の組み合わせの画像を提示し、各細胞画像の判定を行った。

2.6 細胞検出力の比較

AI と人間の細胞検出力の精度を比較するため、AI と 3 人の外科医が、KYSE140 と健常人血液細胞の同一画像を用いて、それぞれ 3 枚ずつ計 6 枚の画像の細胞と認識する DAPI 陽性領域の数の計測を行った。スライド作成開始時に KYSE140 は 1.0×10^5 個、PBMC は 1.0×10^7 個になるように調整を行い、DAPI で染色したスライドを作成した。2×2 視野の画像を撮影して統合した画像を KYSE140 と健常人血液細胞それぞれについて 3 枚ずつ作成した。その後、AI と 3 人の外科医が細胞として認識した DAPI 陽性領域の数を計測し、同時に解析時間も計測した。

2.7 画像識別精度の比較

AI と人間の癌細胞と健常人血液細胞を識別する画像認識精度を比較するために、DAPI および EpCAM で染色した KYSE140 と健常人血液細胞の画像を用いて AI に事前学習を行った。その後、AI と 4 人の外科医に答えを隠した状態で合計 100 枚 (KYSE140 の画像 50 枚と健常人血液細胞の画像 50 枚) の画像セットを 3 セット提供し、示された各細胞画像の判定を行った。同時に 100 枚の画像を判定するのに要した時間も計測した。

2.8 臨床検体

CTC 検出のために、食道扁平上皮癌患者 10 名と健常人ボランティア 5 名から末梢血 (2.5mL) を採取した。採用基準は、2022 年 1 月から 2022 年 10 月の間に食道扁平上皮癌と診断され、富山大学医学部附属病院で治療を受けていることとした。全症例は、the 7th edition of the Union for International Cancer Control system (33) に従って病期分類を行った。

手術患者は全身麻酔中に動脈圧ラインを経由して末梢血を採取した。化学療法を受けた 6 人の患者の血液は正中立方静脈から採取された。健常人ボランティアからは、正中立方静脈より末梢血液を採取した。血液サンプルは 3ml の EDTA 採血管に採取され、採血後 3 時間以内に処理を行った。

本研究のプロトコルは富山大学医学部附属病院の倫理審査委員会により承認され (R2021042) 、すべての参加者から書面でのインフォームドコンセントを得た。

2.9 統計解析

全ての解析は、JMP 16.0 ソフトウェア (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を用いて行った。KYSE140 と健常人血液細胞の画像セットを用いた AI と人間の画像識別精度の差は、Wilcoxon 検定を用いて $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

3. 結果

3.1 AI による細胞株識別精度の検証

AI による癌細胞と健常人血液細胞の画像認識精度を検証するため、ESCC 細胞株 (KYSE30、KYSE140、KYSE520、KYSE1440) と健常人血液細胞の画像を用いて AI に事前学習を行った。その後、答えを隠した状態の表示された各細胞画像の判定を行った。

4 種類の ESCC 細胞株と健常人血液細胞の代表的な画像を Figure2 に示す。健常人血液細胞は、EpCAM の発現がなく、細胞、核ともに小さかった。一方で ESCC 細胞株は細胞および核が大きく、核染色において不均一であった。EpCAM の発現に関しては、KYSE520 では発現は認められなかったが、KYSE30 および KYSE1440 では強く発現しており、KYSE140 では弱く発現していた。

事前学習で使用した細胞と同種の細胞株と健常人血液細胞の識別は良好な結果であり、それぞれ KYSE30 では 99.9%、KYSE140 では 99.8%、KYSE520 では 99.8%、KYSE1440 では 100%の精度で識別することができた (Table I)。また、事前学習で使用した細胞株とは異なる細胞株を使用した識別において、事前学習に用いた細胞株と識別に用いた細胞株の組み合わせにかかわらず、ESCC 細胞株と健常人血液細胞を識別する特異度は 99.6%以上であった。一方、感度は 20.4%~100%であり、事前学習に用いた細胞株とテスト用の細胞株の組み合わせに依存していた (Table I)。

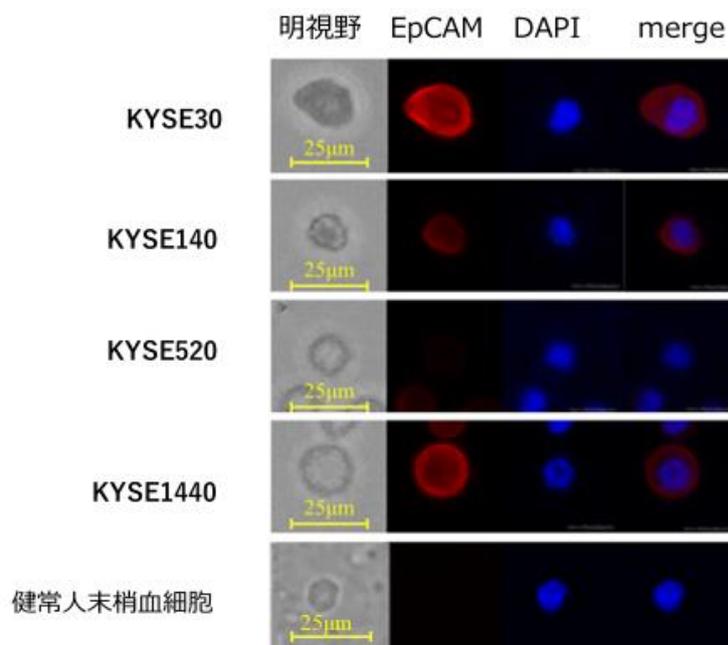
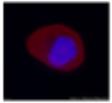
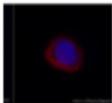
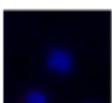
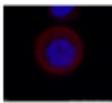


Figure2:ESCC 細胞株と健常人血液細胞の代表的な免疫染色画像。KYSE520 は他の ESCC 細胞株に比して、EpCAM の発現を認めない。

事前学習	評価	精度	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
KYSE30 	KYSE30	99.9	99.8	100	100	99.8
	KYSE140	69.9	39.8	100	100	62.4
	KYSE520	80.7	61.4	100	100	72.2
	KYSE1440	99.9	99.8	100	100	99.8
KYSE140 	KYSE30	96.0	92.4	99.6	99.6	92.9
	KYSE140	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE520	60.0	20.4	99.6	98.1	55.6
	KYSE1440	98.8	98.0	99.6	99.6	98.0
KYSE520 	KYSE30	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE140	70.6	41.6	99.6	99.0	63.0
	KYSE520	99.8	100	99.6	99.6	100
	KYSE1440	99.8	100	99.6	99.6	100
KYSE1440 	KYSE30	99.9	99.8	100	100	99.8
	KYSE140	83.3	66.6	100	100	75.0
	KYSE520	82.9	65.8	100	100	74.5
	KYSE1440	100	100	100	100	100

TableI: 核細胞株毎の画像識別精度

3.2 AI と外科医の細胞検出力の比較

AI と手動の細胞検出力を比較するため、DAPI で染色された KYSE140 と健常人血液細胞の同一画像 3 枚を AI と 3 人の外科医にそれぞれ提供し、DAPI 染色された細胞数を計測させた。

KYSE140 では、AI が平均 1335.3 ± 168.6 個、外科医が平均 1246.1 ± 113.0 個の細胞を検出したが、統計学的有意差は認めなかった ($p=0.71$, Figure3A)。健常人血液細胞を用いた場合、AI は平均 387.7 ± 45.6 個、外科医は平均 425.6 ± 29.1 個の細胞を検出したが、こちらも統計学的有意差を認めなかった ($p=0.58$, Figure3B)。

一方、KYSE140 を用いた場合の検出に要した時間は、AI が平均 4.9 ± 0.3 秒、外科医は平均 591.4 ± 62.4 秒であり、統計学的有意差を認めた ($p=0.016$, Figure3C)。健常人血液細胞を用いた場合の計測時間は、AI が 4.9 ± 0.3 秒、外科医が 243.3 ± 18.8 秒であり、統計学的有意差を認めた ($p=0.016$, Figure3D)。

これらの結果から、AI と人間の細胞検出数を比較すると、検出された細胞数に有意差は認めないが、解析に要する時間では AI の方が有意に短かった。

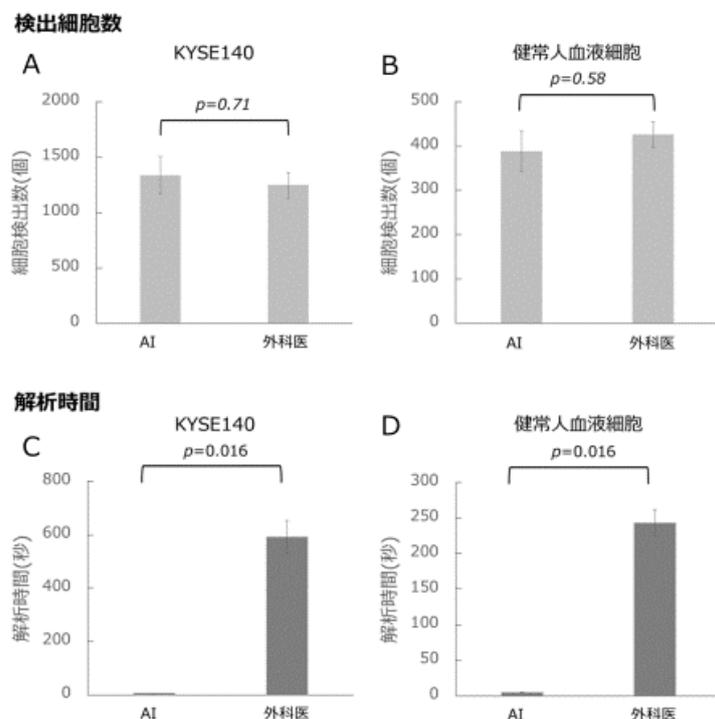


Figure3: 細胞検出数と解析時間の比較

A: KYSE140 の細胞検出数

B: KYSE140 の解析時間

C: 健常人血液細胞の細胞検出数

D: 健常人血液細胞の解析時間

3.3 AI と外科医の画像識別精度の比較

AI と人間の画像識別精度を比較するために、KYSE140 と健常人血液細胞の画像を事前学習した AI と 4 人の外科医に、EpCAM および DAPI で染色した細胞 100 個（KYSE140 50 個、健常人血液細胞 50 個）の画像セットを 3 セット提示した。3 セットの 100 枚の画像を評価した結果、AI は感度・特異度ともに 100% で KYSE140 と健常人血液細胞を完全に識別していた。一方で、外科医は感度 86%、特異度 97.5% であった (Table II)。AI と外科医の平均画像識別精度は 100% と 91.8% であり、統計学的有意差を認めた ($p=0.011$, Figure 4A)。

また、100 枚の画像を分類し終わるのに要した平均時間は、AI が 0.7 ± 0.01 秒、外科医が 630.4 ± 49.5 秒であり、統計学的有意差を認めた ($p=0.012$, Figure 4B)。

これらの結果から、CTC 解析に AI を使用することで、人間と比較して高精度かつ短時間で解析することが示された。

	精度	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
AI	100	100	100	100	100
外科医	91.8	86.0	97.5	86.0	90.0

Table II: KYSE140 と健常人血液細胞を用いた AI と外科医の画像識別精度の比較

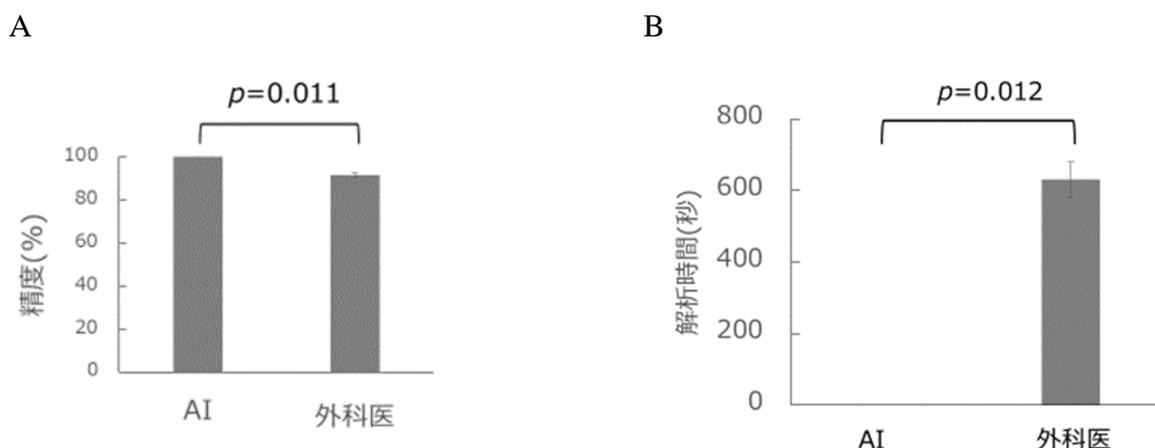


Figure 4: AI と外科医の細胞識別精度と解析時間の比較

A: AI と外科医の細胞識別精度の比較

B: 画像 100 枚当たりの解析時間の比較

3.4 臨床検体を用いた検討

患者群は男性 5 名、女性 5 名からなり、年齢中央値は 71.9 歳（範囲、54-79 歳）であった。病期は I 期が 2 例、III 期が 8 例であった。いずれの患者も採血前に外科手術は施行されていない。患者の臨床病理学的特徴および検出された CTC 候補細胞 (EpCAM 陽性/DAPI 陽性細胞) の数を Table III にまとめた。また、陰性対照群として年齢中央値 35.3 歳（範囲：30-39 歳）の健常人ボランティア 5 名を用いた。

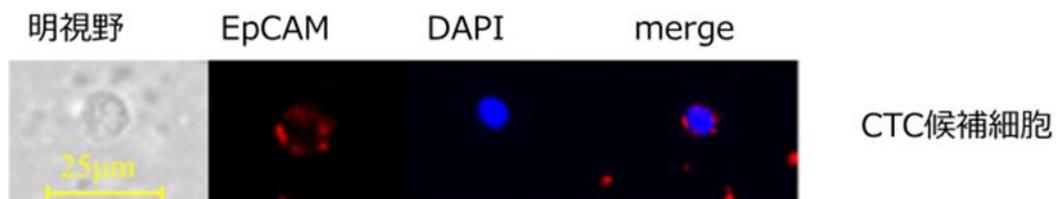
患者から検出された CTC 候補細胞の代表的な画像を Figure 5A に示す。細胞核は DAPI で染色され、細胞表面には EpCAM が発現しており、上皮由来の単核細胞であることがわかる。一方、健常人ボランティアから検出された健常人末梢血細胞は、サイズが小さく、丸い核を示し、EpCAM の発現がないことから、リンパ球と考えられる (Figure 5B)。

CTC 候補細胞は、患者群と陰性対照群の両方で検出されたが、患者群の検出数は平均 44.5 ± 20.9 個であり、陰性対照群の平均 2.4 ± 0.8 個に比べて有意に多かった ($p=0.019$, Figure 5C)。

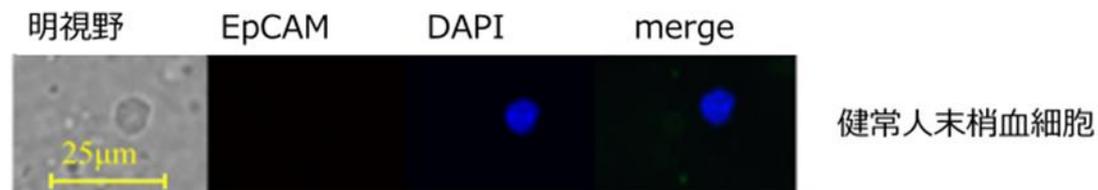
	年齢(歳)	性別	T	N	M	stage	採血前の化学療法歴	CTC候補細胞(個)
患者1	69	F	3	1	0	III	no	23
患者2	54	M	3	1	0	III	yes	60
患者3	73	M	1b	0	0	I	no	1
患者4	71	F	4a	2	0	III	no	8
患者5	79	M	3	1	0	III	no	221
患者6	78	F	3	2	0	III	no	3
患者7	69	M	1b	0	0	I	yes	41
患者8	73	F	3	1	0	III	yes	18
患者9	70	M	3	1	0	III	yes	64
患者10	73	F	3	1	0	III	yes	6

Table III: 患者の臨床病理学的特徴と CTC 候補細胞の数

A



B



C

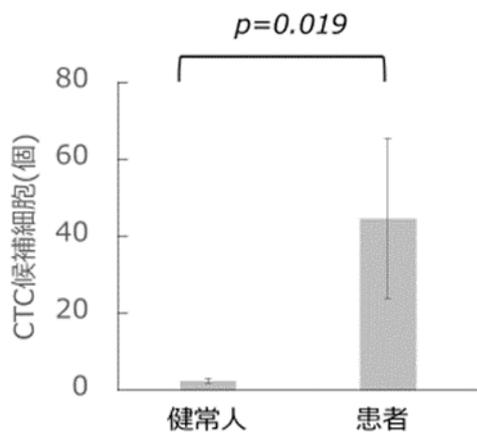


Figure5

A: 食道扁平上皮癌患者における CTC 候補性細胞の代表的な画像。細胞核は DAPI で染色され、EpCAM は細胞膜に沿って発現している。

B: 健常人の CTC 候補細胞の代表画像。細胞核は DAPI で染色されているが、EpCAM は細胞膜に発現していない。

C: 患者群と健常人で検出された CTC 候補細胞の比較

4. 考察

近年、CNN を用いた診断支援ツールの性能は、様々な医療分野の専門家に匹敵するレベルに到達しつつある(34-36)。本研究では CNN を用いた AI アルゴリズムの CTC 検出への応用を ESCC 細胞株と ESCC 患者の血液サンプルを用いて評価した。

事前学習を行った ESCC 細胞株と同じ細胞株を評価した場合、AI は 99.8%以上の精度で細胞株と健常人血液細胞を識別した。また、事前学習と評価に使用した細胞株の組み合わせに関わらず、細胞株と健常人血液細胞を識別する特異度は 99.6%以上であった。一方、感度は 20.4%から 100%とばらつきがあり、事前学習と評価に用いた細胞株の組み合わせによって、一部の癌細胞が健常人血液細胞と誤判定されることが分かった。例えば、KYSE30 で事前学習を行った後に KYSE520 の評価を行った場合、および KYSE1440 で事前学習を行った後の KYSE520 の評価の場合で識別精度が低かったのは、EpCAM 発現量の違いによって説明される。しかしながら、KYSE30 で事前学習を行った場合に、EpCAM の発現量が大きく異なるにもかかわらず、KYSE520 の評価を行うと 99.8%の精度で識別できたことから、AI アルゴリズムは CNN の特徴量を自動的に抽出する性質を用いて EpCAM 発現のみならず細胞の形態、核染色、あるいは人間が認識できていない未知の特徴に基づいて細胞を識別していることが示唆された。これは CNN を用いた診断システムの強みである人間が認識できない階層的な特徴を AI が機械学習し、発見することを示している (37, 38)。

AI と人間による細胞検出の比較では、計測された細胞数に統計学的有意差は認められなかった。一方、AI による細胞株と健常人血液細胞の平均画像識別精度は 100%であり、人間より有意に優れていた。特に、感度は人間の方がより低く、これは一部の癌細胞を健常人血液細胞と誤認したことを示している。AI と人間の精度の違いの原因の一つとして事前学習を行った際に、AI が自律的に学習し、未知の特徴に基づく識別を行うように進化したことが考えられる (39)。一方、人間は EpCAM と DAPI の発現量のみに基づいて細胞株を識別したため、EpCAM の発現が弱い細胞株を健常人血液細胞と誤認した可能性がある。EpCAM の発現だけでなく、細胞の大きさ、形、核・細胞質比など、細胞診で用いられる特徴に基づく認識を行った場合、人間の認識精度がどの程度 AI に近づくかは興味深いところである (40)。しかし、訓練された病理医による細胞診でも主観的な基準に基づいていることが報告されているように、研究者によって識別精度にばらつきがあることは否めない (40)。

細胞検出および細胞識別に要する時間は、AI の平均解析時間が人間の平均解析時間の 850 分の 1 程度であった。スライドの 3 次元構造を考慮して細胞を検出する全範囲検索は、人間では長時間を必要とする。一方、AI はスライドのスライス厚の影響を受けないため、短時間での画像取得と解析が可能になる。解析時間の短縮は医療の効率

化に貢献するとともに、大量の画像学習に基づく AI アルゴリズムの進化を加速させる。

ESCC 患者の血液において、AI を用いた CTC 候補細胞は、これまでの報告と同程度に検出され(41)、臨床応用の可能性が示唆された。また、患者群の CTC 候補細胞の平均数は 44.5 個であったのに対し、健常人群の平均数は 2.4 個であり、こちらも過去の報告と同等であった。(6, 13).

健常人ボランティアにおいても少数の EpCAM 陽性細胞が検出されたことから、患者であっても EpCAM 陽性細胞のすべてが CTC であるとは限らないことが示唆された。EpCAM は、これまでの報告で示されているように、コンタミネーションした皮膚細胞や未熟な血液細胞で発現している可能性がある(5, 42)。しかし、患者群における CTC 候補細胞数が対照群よりも有意に多かったことから、患者の CTC 候補細胞の大部分は CTC であったと考えられる。今後、患者や健常人ボランティアの健常人血液細胞を学習させることで、患者との識別が容易になる可能性がある。

CTC の検出には EpCAM を用いた免疫学的手法が広く用いられている。しかし、EpCAM は上皮特異的の表面マーカーであるため、癌の転移の生物学的プロセスである上皮間葉転換 (EMT) の際に発現が低下する(43-45)。そして、末梢血中の CTC において EpCAM の発現が低下していることが報告されている(46, 47)。EpCAM を用いた positive enrichment の既存のデータでは CTC の検出率は 18~50%程度とされている(41)。また、癌の治療抵抗性(48-50)や腫瘍幹細胞の維持に EMT が関与している(51, 52)ことから、EpCAM 陰性の CTC の臨床的意義が示唆されている。今回用いた negative enrichment を用いる手法では、EpCAM 陰性 CTC の検出率を向上させる解決策として、EpCAM の他に細胞表面ビメンチン (CSV) などの EMT マーカーを加える方法が挙げられる(53, 54)。さらに、解像度の高い画像を使用することや症例数を重ねてカットオフ値を設定することも検出率の向上に役立つ。そこに階層的特徴を自律的に学習・発見する AI の特性を組み合わせ(38)、症例を蓄積することでマーカーによらない未知の特徴に基づく AI アルゴリズムの確立が期待される。

以上より、CTC 解析に AI を用いることで、人の目による手動検出と比較して、高い精度と短時間での画像解析の実現が示唆された。今後、AI アルゴリズムの進化や症例の蓄積に伴い、システムの効率化・自動化が進めば、明視野画像の取得のみといった簡単な試料準備で、迅速かつ正確な診断が可能となり、臨床応用への可能性が示された。

5. 結語

本研究では、CTC の画像解析に AI を用いることで、人間よりも短時間で解析を行いかつ正確な CTC 診断を行うことが出来る可能性を示した。今後、症例数を蓄積することで AI の自律的学習によるアルゴリズムの進化という特性を生かして、さらに高度な CTC 診断システムの構築されることが期待される。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました富山大学 学術研究部医学系 消化器・腫瘍・総合外科教室 藤井 努 教授に厚く御礼申し上げます。また、AI のアルゴリズム構築および画像解析にあたり御指導頂きました富山大学工学部機械工学コース機械情報計測教室 寺林 賢司 准教授に心から感謝致します。また、論文作成にあたり御指導頂きました奥村 知之 講師、および様々な面で実験に協力して下さった消化器・腫瘍・総合外科および機械情報計測教室の方々に感謝申し上げます。

7. 参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al*: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209–249, 2021.
2. Watanabe M, Otake R, Kozuki R, *et al*: Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer. *Surg Today* 50: 12–20, 2020.
3. Castro-Giner F and Aceto N: Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Med* 12: 31, 2020.
4. Ganesh K and Massague J: Targeting metastatic cancer. *Nat Med* 27: 34–44, 2021.
5. Rodrigues P and Vanharanta S: Circulating Tumor Cells: Come Together, Right Now, Over Metastasis. *Cancer Discov* 9: 22–24, 2019.
6. Ujiie D, Matsumoto T, Endo E, *et al*: Circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy are related with recurrence in esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus* 18: 566–573, 2021.
7. Xu HT, Miao J, Liu JW, Zhang LG and Zhang QG: Prognostic value of circulating tumor cells in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 23: 1310–1318, 2017.
8. Ohnaga T, Shimada Y, Takata K, *et al*: Capture of esophageal and breast cancer cells with polymeric microfluidic devices for CTC isolation. *Mol Clin Oncol* 4: 599–602, 2016.
9. Li Y, Wu G, Yang W, *et al*: Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch system in esophageal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 20: 581, 2020.
10. Watanabe T, Okumura T, Hirano K, *et al*: Circulating tumor cells expressing cancer stem cell marker CD44 as a diagnostic biomarker in patients with gastric cancer. *Oncol Lett* 13: 281–288, 2017.
11. Sabine Riethdorf, Herbert Fritsche, Volkmar Müller, *et al*: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13:920–8, 2007.
12. Wu S, Liu S, Liu Z, *et al*: Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PLoS One* 10: e0123976, 2015.
13. Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, *et al*: Detection of circulating tumor cells by p75NTR expression in patients with esophageal cancer. *World J Surg*

Oncol 14: 40, 2016.

14. Kojima H, Okumura T, Yamaguchi T, Miwa T, Shimada Y and Nagata T: Enhanced cancer stem cell properties of a mitotically quiescent subpopulation of p75NTR-positive cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 51: 49-62, 2017.
15. Correnti M and Raggi C: Stem-like plasticity and heterogeneity of circulating tumor cells: current status and prospect challenges in liver cancer. *Oncotarget* 8: 7094-7115, 2017.
16. Semaan A, Bernard V, Kim DU, et al: Characterisation of circulating tumour cell phenotypes identifies a partial-EMT sub-population for clinical stratification of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 124: 1970-1977, 2021.
17. von Gerich H, Moen H, Block LJ, et al: Artificial Intelligence -based technologies in nursing: A scoping literature review of the evidence. *Int J Nurs Stud* 127: 104153, 2022.
18. Schuman JS, De Los Angeles Ramos Cadena M, McGee R, et al: A Case for the Use of Artificial Intelligence in Glaucoma Assessment. *Ophthalmol Glaucoma* 5: e3-e13, 2022.
19. Leonie L. Zeune, Yoeri E. Boink, Guus van Dalum, et al: Deep learning of circulating tumour cells. *Nature Machine Intelligence* 2: 124-133, 2020.
20. Olga Russakovsky, Jia Deng, Hao Su, et al: ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge. *International Journal of Computer Vision* volume 115: 211-252, 2015.
21. Takahisa Akashi, Tomoyuki Okumura, Kenji Terabayashi *et al*: The use of artificial intelligence algorithm in detection of circulating tumor cells in esophageal cancer patients. *Oncol Lett* ~投稿中
22. Appierto V, Serena Di Cosimo, Carolina Reduzzi, et al: How to study and overcome tumor heterogeneity with circulating biomarkers: The breast cancer case. *Semin Cancer Biol* 44:106-116, 2017.
23. Drost J, Wouter R Karthaus, Dong Gao, et al: Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 11: 347-58, 2016.
24. Gao D, Ian Vela, Andrea Sboner, et al: Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159: 176-187, 2014.
25. Denève E, Sabine Riethdorf, Jeanne Ramos, et al: Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 59: 1384-92, 2013.

26. Mostert B, Stefan Sleijfer, John A Foekens, et al: Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35: 463-74, 2009.
27. Kan B, Christina Michalski Helen Fuet, al: Cellular metabolism constrains innate immune responses in early human ontogeny. *Nat Commun.* 9: 4822. 2018.
28. Girardi T, S Vereecke, S O Sulima, et al: The T-cell leukemia-associated ribosomal RPL10 R98S mutation enhances JAK-STAT signaling. *Leukemia.* 32: 809-819, 2018.
29. Wagner J, C Leah Kline, Lanlan Zhou, et al: Dose intensification of TRAIL-inducing ONC201 inhibits metastasis and promotes intratumoral NK cell recruitment. *J Clin Invest* 128: 2325-2338, 2018.
30. Lee SH, Dong-Jun Shin, Yoseop Kim, et al: Comparison of Phenotypic and Functional Characteristics Between Canine Non-B, Non-T Natural Killer Lymphocytes and CD3(+)CD5(dim)CD21(-) Cytotoxic Large Granular Lymphocytes. *Front Immunol* 9: 841, 2018.
31. Baos S, David Calzada, Lucía Cremades-Jimeno, et al: Nonallergic Asthma and Its Severity: Biomarkers for Its Discrimination in Peripheral Samples. *Front Immunol* 9:1416, 2018.
32. Nobuyuki. O: A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9: 62-66, 1979.
33. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C, (editors): *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition, UICC International Union Against Cancer 2010. Hoboken, NJ: Wiley- Blackwell; 2010.
34. Liu X, Faes L, Kale AU, et al: A comparison of deep learning performance against health-care professionals in detecting diseases from medical imaging: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Digit Health* 1: e271-e297, 2019.
35. Kamba S, Tamai N, Saitoh I, et al: Reducing adenoma miss rate of colonoscopy assisted by artificial intelligence: a multicenter randomized controlled trial. *J Gastroenterol* 56: 746-757, 2021.
36. Esteva A, Kuprel B, Novoa RA, et al: Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature* 542: 115-118, 2017.
37. Ramesh AN, Kambhampati C, Monson JR, et al: Artificial intelligence in medicine. *Ann R Coll Surg Engl* 86: 334-8, 2004.
38. Zhou LQ, Wang JY, Yu SY, et al: Artificial intelligence in medical imaging of the liver. *World J Gastroenterol* 25: 672-682, 2019.

39. Zheng S, Lin HK, Lu B, et al: 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. *Biomed Microdevices* 13: 203–213, 2011.
40. Moore MJ, Sebastian JA and Kolios MC: Determination of cell nucleus-to-cytoplasmic ratio using imaging flow cytometry and a combined ultrasound and photoacoustic technique: a comparison study. *J Biomed Opt* 24: 1–10, 2019.
41. Yiding Li, Guiling Wu, Wanli Yang, et al: Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch system in esophageal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 20:581, 2020.
42. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10: 6897–6904, 2004.
43. Gjyrezi A, Galletti G, Zhang J, Worroll D, et al: Androgen receptor variant shows heterogeneous expression in prostate cancer according to differentiation stage. *Commun Biol* 4: 785, 2021.
44. Habli Z, AlChamaa W, Saab R, Kadara H and Khraiche ML: Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers (Basel)* 12: 2020.
45. Miki Y, Yashiro M, Kuroda K, et al: Circulating CEA-positive and EpCAM-negative tumor cells might be a predictive biomarker for recurrence in patients with gastric cancer. *Cancer Med* 10: 521–528, 2021.
46. Han D, Chen K, Che J, Hang J and Li H: Detection of Epithelial–Mesenchymal Transition Status of Circulating Tumor Cells in Patients with Esophageal Squamous Carcinoma. *Biomed Res Int* 2018: 7610154, 2018.
47. Ito T, Kudoh S, Ichimura T, et al: Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch signaling and expression of achaete-scute complex homologue 1. *Hum Cell* 30: 1–10, 2017.
48. Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al: Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527: 472–476, 2015.
49. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, et al: Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway. *Lung Cancer* 62: 8–14, 2008.
50. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al: Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer.

Nature 527: 525-530, 2015.

51. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell 133: 704-715, 2008.

52. Liu S, Cong Y, Wang D, et al: Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. Stem Cell Reports 2: 78-91, 2014.

53. Gao Y, Fan WH, Song Z, Lou H and Kang X: Comparison of circulating tumor cell (CTC) detection rates with epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and cell surface vimentin (CSV) antibodies in different solid tumors: a retrospective study. PeerJ 9: e10777, 2021.

54. Chaw SY, Abdul Majeed A, Dalley AJ, Chan A, Stein S and Farah CS: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. Oral Oncol 48: 997-1006, 2012.