

テクスチャ画像解析の医学応用 ～第2次高調波発生像による病態診断へのアプローチ～

齋藤卓^{1,2,3}, 清松悠⁴, 大嶋佑介^{1,2,3}, 今村健志^{1,2,3}

¹ 愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター

² 愛媛大学大学院医学系研究科分子病態医学講座

³ 愛媛大学プロテオサイエンスセンター

⁴ 愛媛大学大学院医学系研究科整形外科学

概要

テクスチャ解析は、画像の空間パターンを数値化し画像分類を行う手法である。第2次高調波発生は、近年のバイオイメージングの発展を支える技術であり、医学研究への応用が進んでいる。この2つの技術を融合した研究は、生命現象の基礎的な理解のみでなく、病態診断への期待もあり、活発に研究が行われ始めている。本論文では、これらがどのような医学的問題を解決するために利用されているのかを解説する。

Biomedical Applications of Texture Image Analysis

～Toward the Development of SHG Imaging Based Diagnostic Tools～

Takashi Saitou^{1,2,3,*}, Hiroshi Kiyomatsu⁴, Yusuke Oshima^{1,2,3}, Takeshi Imamura^{1,2,3}

¹ Translational Research Center, Ehime University Hospital

² Molecular Medicine for Pathogenesis, Graduate School of Medicine, Ehime University

³ Division of Bio-imaging, Proteo-Science Center, Ehime University

⁴ Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, Ehime University

Abstract

Texture image analysis plays a pivotal role in characterizing object properties. This technique numerically represents the spatial arrangement of the gray levels of digital images, and is used on problems of classifying image data sets. Second harmonic generation, an optical label-free technique based on nonlinear optical effects, is recognizing important for biomedical applications. Researches that integrate these two technologies are increasingly being used not only for advancing basic understanding of biological processes, but also for applications of clinical diagnosis. Here, we highlight recent advances in this combined research area, and describe how this approach is used in tackling medical problems.

1 導入

光を利用すると、非侵襲的に生体を傷つけることなく試料を観察できる。そのため生物学・医学の研究分野では光学顕微鏡が幅広く利用されてきた。近年、光学顕微鏡技術を含めたバイオイメーjing技術は、大きな発展を遂げており、組織・個体における複雑な時空間動態が1細胞レベルの分解能で観察できるようになってきている[26, 35, 37, 45, 49]。この技術革新の代表的なものの1つに、非線形光学顕微鏡がある。物質に強い光が入射すると、入射光の2乗3乗に比例した、光吸収等の現象が誘起される。このような非線形光学現象を利用し対象を観察する顕微鏡が非線形光学顕微鏡であり、バイオイメーjingに用いられる非線形光学現象としては、第2次（第3次）高調波発生、2光子（3光子）蛍光励起、コヒーレントアンチストークスラマン散乱などがある[17]。本論文では、これらのうち第2次高調波発生（Second Harmonic Generation; SHG）[6, 19]を利用した研究に注目する。SHGは、2つの光子が同時に中心対称性を欠損する物質に入射した後、入射光の半分の波長を持った1つの光子が放出される現象である。発生条件が厳しいため、生体内ではコラーゲン繊維のような構造体が選択的に可視化される。SHGを医学応用するうえでの利点としては、励起光が長波長であることによる深部到達性の向上や低障害性、また、無染色・無標識でのイメーjingが可能であることが挙げられる。このような利点から近年、SHGイメーjingは基礎的な生物学・医学研究に活用されるのみでなく、病態の診断技術としても注目を集め、この技術を利用した研究が数多く行われるようになってきている[7, 14, 41, 46]。

一方で、このようなバイオイメーjing技術の発展に伴って得られたデジタル画像データを解析する数理的技術の重要性が認識されるようになってきている[8, 18, 48]。このような技術は、イメーjingに基づくデータから生命動態情報を定量的にかつ客観的に抽出するうえで欠かせない技術であり、さらに、定量評価法の確立は病態診断のような臨床応用に向けての本質的な要素となる。テクスチャ画像解析は、古くから画像認識の分野で使用されてきた技術であり、物体表面などの模様を数値化し、分類・判別を行うための道具と

して開発が進められてきた[4, 36]. 近年になって, バイオイメージングへの応用が進んでおり, 生体組織の分類や状態判別に利用されるようになってきている[10].

SHG イメージングは, コラーゲン (ヒトの総タンパク質量の 30%程度を占める) のような生体組織中に存在量が多い分子を可視化する技術であるため, 得られた画像の中で, SHG シグナルは全体的な広がりを持ち, 同時に, 密集度・方向性・周期性などを反映した多様なパターンを示すことが多い. テクスチャ解析は, 元来, 複雑な模様を分析する手段として使われてきたものであるので, SHG 像の解析には適していると言える. 実際, SHG イメージングの利用頻度の増加に伴って, SHG とテクスチャ解析を組み合わせ, 生体組織画像診断に取り組んだ研究例が多く出てきている. 本論文では, SHG イメージングとテクスチャ解析法の基本的な説明から始めて, これらがどのような医学的問題を解決するために利用されているのかを解説する. 最後に, 先端的イメージング技術と数理科学的手法の融合が医学研究の中でどのように展開されていくのかについて議論する.

2 第2次高調波発生 (SHG) イメージング

バイオイメージングは, 細胞や組織, また, 個体において, 生体分子がいつどこでどのように機能しているかを可視化する技法であり, 今や生命科学の研究にとって欠かすことのできないものとなっている. 蛍光顕微鏡と蛍光プローブの進歩がその発展に大きく貢献してきた. 空間分解能に優れた共焦点顕微鏡, 非線形光学現象を利用した多光子励起顕微鏡, さらに, 光の回折限界を超えた解像度を与える超解像顕微鏡などが顕微鏡の発展として挙げられる. 蛍光プローブにおいては, 緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) に代表される様々な蛍光分子の発見と改良が積み重ねられてきた. 蛍光分子・蛍光顕微鏡を利用することで, 細胞・組織内の特定の分子を染色し, 細胞以下の空間スケールでの分子の細胞内分布を可視化することができる. このような技術的発展によって, 生命機能の解明に必要な分子のはたらきを生体内において直接観察することが可能となった[26, 37, 45].

しかしながら, このような蛍光に基づくバイオイメージングにおいては, 生体試料を染色することが必要であり, 臨床応用へ向けては困難が伴う. そこで, 生体分子の光学特性を利用することで, 試料を染色することなく画像を取得することが可能な無染色イメージングが注目されている. SHG イメージングは, そのような無染色で分子レベルの観察が可能な, 非線形光学現象を利用した技術である. SHG は, コラーゲンなどの繊維状構造物を特異的に観察することができるものであり, 医学への応用を目指した研究が近年急速に進んでいる. ここでは SHG について概説すると共に, 実際の応用例について紹介する.

2.1 第2次高調波発生 (Second Harmonic Generation; SHG)

入射光の波長の半分の波長を持つ光が観察される 2 次の非線形光学現象が, SHG である (Fig.1A) [6, 19]. SHG は, 極性を持つ分子や結晶など, 非中心対称性の構造を有する部位でのみ発生し, 発生条件の厳しさゆえに分子や構造を特異的に観察することができる. これまで, SHG の条件を満たすタンパク質として報告されているのはコラーゲン, ミオシン, チューブリンである[7]. SHG イメージングは, 超短パルスレーザーと呼ばれる特殊なレーザー光源を用いて焦点部での光子密度を高めることによって可能となる. SHG を医学応用するうえでの利点として, 無染色イメージングが可能であること以外に, 励起光が長波長であることによる深部到達性の向上や低生体障害性などがある.

実際に SHG を利用した生体組織の観察結果を示す. Fig.1B はメダカの体幹部分の SHG 像である. この SHG シグナルは, 筋肉組織のミオシンから主に発生しているものと考えられ, 筋組織の周期的構造が特徴的に見てとれる. Fig.1C は, マウスの関節軟骨の SHG 像であり, 軟骨に多く含まれる II 型コラーゲンが SHG を発生している. 緑色に表示された部分は軟骨細胞の核であり, 青色で表示された部分が SHG 像になる. ミオシンやコラーゲンは極性を持ち, 生体内で同一方向に配列し, 繊維状の組織を構成することから, SHG を効率よく発生させ可視化することができる. したがって, SHG を応用することで, 生体組織の構造やその変化の観察が可能となる.

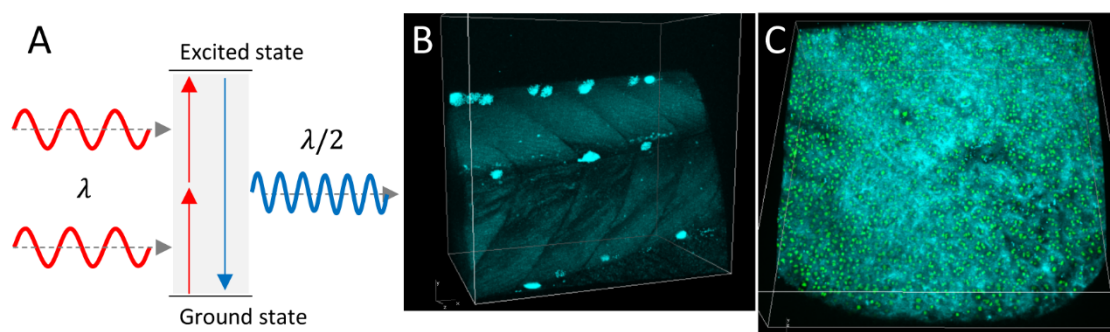


Fig.1. (A) Principle of SHG imaging. Through this nonlinear optical effect, two photons with the wavelength (λ) are converted into a photon with half the wavelength ($\lambda/2$). (B) A 3D reconstructed SHG image of the medaka, *Oryzias latipes*, body trunk. (C) A 3D reconstructed SHG image of the normal articular cartilage in a H2B-GFP mouse.

3 テクスチャ画像解析

テクスチャとは, 元々は布地の織目模様を意味する言葉であり, 物質表面の質感を表す概念である. 物体表面のテクスチャは粗さ, 滑らかさ, 周期性, 乱雑さのような, 物体を識別するための豊富な情報を与えると期待され, そのコンピュータを用いた識別のため, これまで種々の方法が開発されてきた. いくつかの総説[4, 10, 36]に従えば, テクスチャ画像解析は次の 4 つの方法, (1) 構造的解析法, (2) 統計的解析法, (3) モデルベースの解析法, (4) 変換ベースの解析法に分類される.

(1) 構造的解析法では、画像から線のような決められた構造要素を取り出し、それらの配置ルールを探索することによってテクスチャの特徴付けを行う方法である[9, 53]. この方法は道路や自動車のような人工物の認識には有効であるが、限定された要素しか取り出すことができないため用途に限られる. (2) 統計的解析法では、画像の輝度値の空間分布や局所的関係性などから統計量を計算することでテクスチャの特徴を抽出する方法である. 次節で紹介する Haralick らによって考案されたグレーレベル同時生起行列 (Gray Level Co-occurrence Matrix; GLCM) を用いる方法[23]はここに分類される. GLCM の他に、ランレングス (run length) 行列が使われることもある[20]. 対象の形状などが不明瞭な画像の性質を抽出できるため、一般的に使いやすく、ゆえに、生物画像とも相性が良いと考えられる. (3) モデルベースの解析法は、統計学的な分析モデルに基づく方法であり、よく利用されるものとして、回帰モデル[43]、マルコフ確率場[16]やフラクタル[28]が挙げられる. (4) 変換ベースの解析法は、空間周波数のような異なる空間にマッピングされた情報を解析する方法であり、フーリエ変換やウェーブレット変換などがよく使用される[39].

本論文では、統計的テクスチャ解析法の1つであり、かつ、医学画像での応用例の多い、Haralick らによる GLCM を利用するテクスチャ解析法[23]に焦点を当てる. その基本的な計算過程は次の通りである. この方法は、Fig.2A に示してあるように 2 つの過程、(i) GLCM の計算、(ii) 特徴量の計算、に分けられる. (i)では、画像中の特定の位置関係にある 2 つの画素からその濃度対に関して統計を取り、行列を作成する. そのために、まず、角度(θ)とピクセル間距離(d)によって相対位置を定義する (Fig.2B). 次に、その画素対に対する輝度値を読み取り、これを(i, j)とする. すべての相対位置関係を満たす画素対に対して同様の計算を行い、累積数を行列 GLCM (P で表す) の(i, j)成分として記録する. (ii)では、GLCM をさらに加工することで特徴量を計算する. Haralick らの原論文においては、14 種類の特徴量が提案されているが、そのうち代表的な特徴量であり、実際に使用例の多い特徴量 5 つ、Angular Second Moment (ASM), Contrast, Correlation, Inverse Difference Moment (IDM), Entropy を Fig.2C に挙げる. ASM は、GLCM 成分の 2 乗和を取る特徴量で、画像の均質性を表す. Contrast と IDM は GLCM 成分間の差を取っているため画像の局所的な明暗の度合いを表す. Correlation は輝度値の局所的相関を表し、Entropy は輝度値のピクセルへの分配の乱雑さを表す指標となる. Fig.3A は Fig.1C のマウス軟骨 SHG 像の一部分を構成する 2 次元の画像であり、この画像について実際にテクスチャ特徴量を計算したものが Fig.3B と Fig.3C である. ここでは、角度 $\theta=0^\circ$ での ASM (Fig.3B)と Correlation (Fig.3C)を距離 d の関数としてプロットしている. 両特徴量共に、近傍画素の均質性を反映して距離 d が大きくなるにつれて数値が下がっている. また、軟骨小腔の構造を反映して ASM では距離の大きさと共に数値の上昇が見られ、Correlation では周期的な数値の浮き沈みが見てとれる. これらの特徴量の計算方法については、規格化法の提案[2]や計算速度の向上[22]など近年になっても開発が進められている.

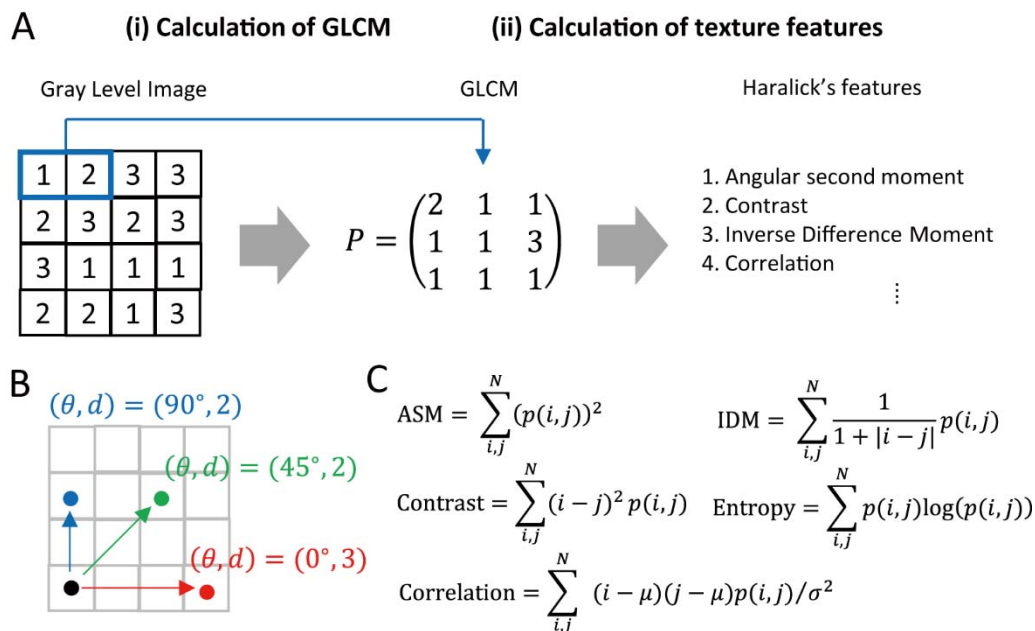


Fig.2. (A) Illustration of Haralick's texture feature calculations. The process is divided into two parts, (i) the calculation of GLCM from a digital image and (ii) the calculation of texture features from GLCM. (B) The definition of the angle (θ) and the pixel distance (d). (C) Representative texture features. Listed are ASM, Contrast, Correlation, IDM and Entropy.

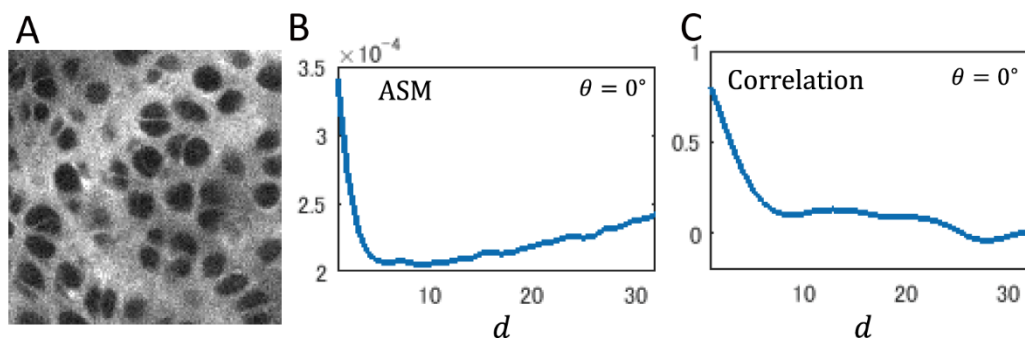


Fig.3. (A) A 2D cropped image from the SHG channel of the Fig.1C data. (B) Plotting of ASM as a function of the pixel distance (d). (C) Plotting of Correlation as a function of d .

GLCM を用いたテクスチャ解析法は、医学画像解析への応用も行われており、MRI 画像への応用[13, 21, 24]、CT 画像への応用[11]、超音波画像への応用[3]、細胞画像への応用[34, 42]などが報告されている。これらの報告は GLCM によるテクスチャ解析が多様なスケールのバイオイメージング画像に有効であることを示唆するものである。テクスチャ解析は、前述のように空間構造に関する前知識がなくとも利用できる手法であり、その応用範囲は広いと考えられる。しかしながら、バイオイメージング画像への応用は GLCM 以外の方法、例えばモデルベースの方法やフーリエ変換など変換ベースの方法、の有効性も示

されており[10], どの種の画像に対してどの方法が最適なのかということに関しての包括的な研究はまだされておらず, これに関しては更なる研究の蓄積が必要と思われる。

4 GLCM を用いたテクスチャ解析の医学応用

ここでは, 実際に SHG 像に対して GLCM によるテクスチャ解析を適用し, 定量的な画像解析を行った研究例について解説する。

4.1 軟骨組織 SHG 像のテクスチャ解析

軟骨は, II 型コラーゲンを多く含む組織であるため, SHG により軟骨の無染色イメージングが可能である。これを利用し, Werkmeister らは, 軟骨のコラーゲンの構造変化を解析している[50]。変形性関節症 (Osteoarthritis; OA) は, 関節軟骨の微細な損傷が原因で起こる疾患であり, 早期診断はこれまで困難であった。軟骨を可視化する技術がなかったことがその理由の 1 つである。したがって, SHG イメージングが新規の軟骨診断技術として期待される。論文の中で著者らは, 変形性関節症で起こる関節軟骨の損傷に似せた軟骨変性を人為的に誘導するシステムを構築し, 2 光子励起顕微鏡による SHG イメージングを行っている。軟骨の変性を実験的に誘導する方法として, 力学的な圧力をかける方法とコラーゲンを分解する酵素であるコラーゲナーゼを用いた生化学的な方法を用いている。軟骨サンプルは, ヒト大腿骨関節から採取された。サンプル内の数 10 μ m 四方の関心領域を選択し, この領域で SHG 像に対して, グレーレベル生起行列と Haralick 特徴量の計算を行っている。特徴量として, ASM, Contrast, Correlation, Variance, IDM, Sum average, Sum variance, Sum entropy, Entropy を計算している。力学的圧力を加えた場合には, 軟骨組織がコンパクトに, かつ, 密になるのに伴って, 均質性を示す特徴量 (例えば, ASM) の上昇が確認された。一方, 酵素によるコラーゲンの分解作用を与えた場合には, 均質性が下がるという逆の結果が得られている。著者らは, さらに, 数種の特徴量を用いて, 主成分分析を行うことで, コラーゲン繊維の状態の定量的な分類が可能であることを示している。このことから軟骨の状態を SHG イメージングとテクスチャ解析を組み合わせることで軟骨診断への応用が期待される。

4.2 がん組織 SHG 像のテクスチャ解析

がん細胞を覆う細胞外基質の主たる成分である I 型コラーゲンも SHG イメージングによって可視化することができる。細胞外基質は, がん組織周囲の微小環境を形成するが, これまでがんの悪性化との関連が様々な研究で指摘されている。Kakkad らは, コラーゲン密度と乳がんのリンパ節転移との相関を調べるために SHG イメージングとテクスチャ解析を利用し, 解析を行っている[27]。乳がんのリンパ節転移を起こした患者 (LN+) と起こしていない患者 (LN-) から乳がん原発巣のサンプルを採取し, SHG による観察を行い,

LN+組織のほうがLN-組織よりもI型コラーゲンの密度が高いという結果を得ている。さらに、テクスチャ解析による検証を行うと、ASM, Correlationのパラメータについて、LN+サンプルとLN-サンプルとの間で統計的な有意差が出ることが示されている。このことは、コラーゲン繊維のテクスチャが乳がんのリンパ節転移のバイオマーカーとして利用できることを示唆している。

また、卵巣がんの生検サンプルに対してSHGによる評価を行った研究もある[29]。卵巣表面とその直下に位置する基質をSHGによって観察し、テクスチャ解析を通して正常な組織と異常性を示す組織との間でコラーゲン繊維の変化を評価することで、病態の分類を行っている。

4.3 皮膚組織SHG像のテクスチャ解析

皮膚では、表皮の下層にある真皮組織が高い含有率でコラーゲンを保持している。そのため、皮膚組織のSHGイメージングを行うことで真皮の特異的な構造情報が取得できる[52]。Cicchiらは、ヒトの正常、瘢痕、ケロイドの真皮組織のSHG像に対してGLCMによるテクスチャ解析を行い、皮膚組織の状態のスコアリングを試みている[15]。特徴量としてASM, Contrast, Correlation, IDMの4つを計算し、ケロイド組織のほうが正常表皮よりも均質性が高いことを示しており、GLCM法による解析のスコアリング化で皮膚のコラーゲン繊維の構造の特徴が捉えられることを示している。

骨形成不全症(Osteogenesis Imperfecta; OI)は、骨変形など骨の脆弱性を示す疾患であるが、同時に結合組織の異常を示す疾患でもある。Adurらは、皮膚組織の生検サンプルに対して、SHGイメージングとGLCM法を用いることで、骨形成不全症の分類を行った[1]。コラーゲン密度はOI真皮では正常真皮に比べて低いことが、SHG像の観察によって得られており、GLCM法によるテクスチャ解析の特徴量ASMを用いることで、正常、軽度、重度の症状に対応するコラーゲン繊維パターンの分類に成功している。

4.4 ミオシンSHG像の解析

ミオシンもSHGを生じる分子であり、ミオシンが多く含まれる筋組織でその観察ができる[5]。Liuらは、ヒトとマウスの骨格筋サンプルを用いて、SHGイメージングによる観察を行っている[31]。テクスチャ特徴量を距離の関数としてプロットしたデータからカーブフィッティングとフーリエ変換により2つのスコア、SスコアとRスコア、を抽出し、筋組織の状態をこのスコアによって評価している。さらに、Pompe病の病態とスコアとの間に強い相関があることを示している。

4.5 GLCM法の改良と応用

コラーゲンのような特殊な分子を可視化する技術であるSHGイメージングは、得られた画像が多様で乱雑なものでありながらも繊維状に配向したような決まったパターンも同

時に見える場合が多い。そのような SHG 像に特化したテクスチャ解析法の改良, また, その発展的利用法が考案されている。

Mostaco-Guidolin らは, 輝度値ヒストグラムからの 1 次統計量とテクスチャ解析の特徴量を組み合わせて, 病態に由来するコラーゲン繊維の変化が, 機械学習による自動分類が可能であるかどうかを検証している[38]。実験サンプルは, 梗塞を起こしたラットの心筋と動脈硬化を起こしたうさぎの動脈を用いている。1 次統計量として, 輝度値平均, 密度, 歪度, 尖度が用いられ, Haralick 特徴量として, ASM, Contrast, Correlation, IDM, Entropy が用いられている。また, 特徴量は 4 方向について計算され, その平均が計算されている。心筋については, 脂肪幹細胞による処置を行ったもので行っていないものを SHG イメージング, それに続き, テクスチャ解析を行っている。脂肪由来幹細胞処理を行ったもので行っていないもので 1 次統計量では大きな差が見られないが, GLCM を用いた特徴量では差が見られた。その後, サポートベクターマシンを用いて, 分類精度の検証を行ったところ, 1 次統計量と Haralick 特徴量, それぞれ独立に用いた場合には精度は 90%を超えることはなかったが, 同時に用いた場合には 90%を超える精度が得られている。動脈硬化を起こした動脈組織については, マニュアル (人の目) で画像を密度や方向性の違いから 5 つの種類に分類し, その後 Haralick 特徴量を計算している。統計検定の結果からは, 1 次統計量, Haralick 特徴量共に独立には分類が上手くいかないが, 両方の統計量を合わせてサポートベクターマシンで分類を行うと 90%以上の分類精度が獲得された。

方向依存性 (Orientation-Dependent) な GLCM 法 (OD-GLCM 法) の提案がされている[25]。著者らは, SHG 像から得た GLCM からコラーゲン繊維の規則性とサイズを評価する方法を考案し, それをラットの腱とヒトの臍臓細胞の分類に適用している。若齢と老齢のラットに対して, 配向の規則性とサイズの検証を行い, 老齢ラット群のほうが配向性がより高く, サイズも大きいということが示されている。また, ヒト臍臓の正常細胞とがん細胞に対して, 彼らの方法を適用することで, ラットの場合と同じように方向性の情報が分類精度に重要であることを示している。これらのことから, コラーゲン繊維の配向の規則性が基質の構造や細胞の状態に重要であることが示唆される。

5 その他のテクスチャ解析法の医学応用

これまで解説してきた GLCM 法を用いた解析以外にも, SHG イメージングと変換ベースのテクスチャ解析法を組み合わせた研究例が報告されている。[33]では, 角膜基質の SHG を計測し, 円錐角膜と正常角膜の違いを比較している。定量的な指標を得るために, フーリエ変換を用いてコラーゲン繊維の方向性に対するアスペクト比を計算し, 円錐角膜と正常角膜でその値に統計的有意差があることを示している。また, 皮膚がんの一種である皮膚繊維肉腫によるコラーゲン繊維の変化をフーリエ変換によって捉えた研究もある[51]。ウェーブレット変換を用いた研究例もあり, Tilbury らは, 特発性肺線維症の組織でのコラ

ーゲン繊維の変化を捉えた[47]. Local binary pattern とウェーブレット変換を用いて、瘢痕の定量化に取り組んだ研究も報告されており、コラーゲン繊維の均質性、方向性、粗野性の評価によって正常な皮膚と異常な皮膚のテクスチャによる分類に成功している[12, 32].

6 今後の展開

本論文では, Haralick らによる GLCM を用いたテクスチャ解析法の SHG 画像への応用に焦点を当てた. SHG は, コラーゲン・ミオシン・チューブリンなどを特異的に可視化する技術であり, その撮像された画像は多様で複雑なパターンを示している場合が多い. この理由から, 滑らかさ, 粗さ, 規則性などを数値化し特徴付けするテクスチャ解析法は, SHG 像の定量的評価を目的とした解析に有効であると考えられる. 実際, 本論文で紹介したように複数の研究が SHG シグナルパターンの数値化に成功しており, これらは新規病態診断手法としての期待が持たれている. 我々のグループでも, SHG イメージングを利用して変形性関節症の早期診断法の確立を目指し研究を行っている[30]. 本論文で解説したように, Werkmeister ら[50]は, 力学的・化学的作用によってストレスを与え, 変形性関節症に似せた軟骨変性を誘導しているが, 我々は, 変形性関節症を発症するモデルマウスを作成することで実際の症状に近い状況を生体内で再現し, 微細な軟骨損傷を捉えることに成功している. 現在は, 臨床現場での診断法として実用化を目指した SHG 像のテクスチャ解析に取り組んでいる. このような臨床応用を意識した実験モデルと数理解析モデルの融合が今後さらに重要になっていくと考えられる.

今後もこのような融合研究はますます増えていくと期待されるが, さらなる発展のために計算技法の開発が必要になると考えられる. イメージングによって得られる画像データサイズは非常に大きなものになりつつあり, そのようなデータを解析していくプラットフォームや計算速度向上のための手法が必要である. 自動化やハイスループットに重点が置かれた研究は「バイオイメージインフォマティクス」と呼ばれ, 生物学・医学と画像情報学との融合分野として進展しつつある[40]. また, 数理モデリング・数値シミュレーションをイメージングと組み合わせ生体機能を抽出する研究も生物分野では活発に研究されるようになってきており[44], 現代的な数値計算技法を取り入れていくことも重要であると思われる.

基礎研究レベルで開発した診断手法を実際に臨床応用することには大きな課題があると思われる. レーザーの生体へのダメージの問題や光学計測機器の問題は当然のことながら存在し, 計測系が変わることに対応して計算手法の最適化を考えなければならない. さらに, 臨床現場ではより多様な像が得られる可能性があることを考慮して, 計算方法の適用範囲の検証はより厳密に行わなければならないと考えられる.

謝辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業（CREST）研究領域「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」研究課題「新規超短パルスレーザーを駆使した *in vivo* イメージング・光操作のがん研究・がん医療への応用」の助成を受けたものです。

References

- [1] Adur J, L DS-L, Pedroni MV, Steiner CE, Pelegati VB, et al. The severity of Osteogenesis imperfecta and type I collagen pattern in human skin as determined by nonlinear microscopy: proof of principle of a diagnostic method. *PloS one*. 2013;8(7):e69186.
- [2] Aksoy S, Haralick RM. Feature normalization and likelihood-based similarity measures for image retrieval. *Pattern recognition letters*. 2001;22(5):563-82.
- [3] Alvarenga AV, Pereira WC, Infantosi AF, Azevedo CM. Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images. *Medical physics*. 2007;34(2):379-87.
- [4] Bharati MH, Liu JJ, MacGregor JF. Image texture analysis: methods and comparisons. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 2004;72(1):57-71.
- [5] Boulesteix T, Beaupaire E, Sauviat MP, Schanne-Klein MC. Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes: measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Optics letters*. 2004;29(17):2031-3.
- [6] Boyd RW. *Nonlinear Optics*: Elsevier Science; 2003.
- [7] Campagnola PJ, Loew LM. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature biotechnology*. 2003;21(11):1356-60.
- [8] Cardona A, Tomancak P. Current challenges in open-source bioimage informatics. *Nature methods*. 2012;9(7):661-5.
- [9] Carlucci L. A formal system for texture languages. *Pattern Recognition*. 1972;4(1):53-72.
- [10] Castellano G, Bonilha L, Li L, Cendes F. Texture analysis of medical images. *Clinical radiology*. 2004;59(12):1061-9.
- [11] Chabat F, Yang GZ, Hansell DM. Obstructive lung diseases: texture classification for differentiation at CT. *Radiology*. 2003;228(3):871-7.
- [12] Chen G, Liu Y, Zhu X, Huang Z, Cai J, et al. Phase and Texture Characterizations of Scar Collagen Second-Harmonic Generation Images Varied with Scar Duration. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*. 2015;21(4):855-62.

- [13] Chen W, Giger ML, Li H, Bick U, Newstead GM. Volumetric texture analysis of breast lesions on contrast-enhanced magnetic resonance images. *Magnetic resonance in medicine*. 2007;58(3):562-71.
- [14] Chen WL, Hu PS, Ghazaryan A, Chen SJ, Tsai TH, et al. Quantitative analysis of multiphoton excitation autofluorescence and second harmonic generation imaging for medical diagnosis. *Computerized medical imaging and graphics : the official journal of the Computerized Medical Imaging Society*. 2012;36(7):519-26.
- [15] Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, et al. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *Journal of biophotonics*. 2010;3(1-2):34-43.
- [16] Cross GR, Jain AK. Markov random field texture models. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*. 1983(1):25-39.
- [17] 電気学会次世代バイオメディカルレーザ応用技術調査専門委員. バイオメディカルフォトリクス: 生体医用光学の基礎と応用: 電気学会; 2009.
- [18] Eliceiri KW, Berthold MR, Goldberg IG, Ibanez L, Manjunath BS, et al. Biological imaging software tools. *Nature methods*. 2012;9(7):697-710.
- [19] Franken P, Hill A, Peters Ce, Weinreich G. Generation of optical harmonics. *Physical Review Letters*. 1961;7(4):118.
- [20] Galloway MM. Texture analysis using gray level run lengths. *Computer graphics and image processing*. 1975;4(2):172-9.
- [21] Gibbs P, Turnbull LW. Textural analysis of contrast-enhanced MR images of the breast. *Magnetic resonance in medicine*. 2003;50(1):92-8.
- [22] Gipp M, Marcus G, Harder N, Suratanee A, Rohr K, et al. Haralick's Texture Features Computation Accelerated by GPUs for Biological Applications. *Modeling, Simulation and Optimization of Complex Processes: Springer*; 2012. p. 127-37.
- [23] Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein IH. Textural features for image classification. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on*. 1973(6):610-21.
- [24] Herlidou S, Grebe R, Grados F, Leuyer N, Fardellone P, et al. Influence of age and osteoporosis on calcaneus trabecular bone structure: a preliminary in vivo MRI study by quantitative texture analysis. *Magnetic resonance imaging*. 2004;22(2):237-43.
- [25] Hu W, Li H, Wang C, Gou S, Fu L. Characterization of collagen fibers by means of texture analysis of second harmonic generation images using orientation-dependent gray level co-occurrence matrix method. *Journal of biomedical optics*. 2012;17(2):026007.
- [26] 石井優. 特集生きたままの姿を見る 4D イメージング: 羊土社; 2011.

- [27] Kakkad SM, Solaiyappan M, Argani P, Sukumar S, Jacobs LK, et al. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. *Journal of biomedical optics*. 2012;17(11):116017.
- [28] Keller JM, Chen S, Crownover RM. Texture description and segmentation through fractal geometry. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*. 1989;45(2):150-66.
- [29] Kirkpatrick ND, Brewer MA, Utzinger U. Endogenous optical biomarkers of ovarian cancer evaluated with multiphoton microscopy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2007;16(10):2048-57.
- [30] Kiyomatsu H, Oshima Y, Saitou T, Miyazaki T, Hikita A, et al. Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomedical optics express*. 2015;6(2):405-20.
- [31] Liu W, Raben N, Ralston E. Quantitative evaluation of skeletal muscle defects in second harmonic generation images. *Journal of biomedical optics*. 2013;18(2):26005.
- [32] Liu Y, Zhu X, Huang Z, Cai J, Chen R, et al. Texture analysis of collagen second-harmonic generation images based on local difference local binary pattern and wavelets differentiates human skin abnormal scars from normal scars. *Journal of biomedical optics*. 2015;20(1):016021.
- [33] Lo W, Chen WL, Hsueh CM, Ghazaryan AA, Chen SJ, et al. Fast Fourier transform-based analysis of second-harmonic generation image in keratoconic cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(7):3501-7.
- [34] Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell and tissue research*. 2005;322(2):257-67.
- [35] Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development*. 2003;17(5):545-80.
- [36] Materka A, Strzelecki M. Texture analysis methods—a review. Technical university of lodz, institute of electronics, COST B11 report, Brussels. 1998:9-11.
- [37] 宮脇敦史. 蛍光イメージング革命: 生命の可視化技術を知る・操る・創る: 学研; 2010.
- [38] Mostaco-Guidolin LB, Ko AC, Wang F, Xiang B, Hewko M, et al. Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Scientific reports*. 2013;3:2190.
- [39] Orlov N, Shamir L, Macura T, Johnston J, Eckley DM, et al. WND-CHARM: Multi-purpose image classification using compound image transforms. *Pattern Recognit Lett*. 2008;29(11):1684-93.
- [40] Peng H. Bioimage informatics: a new area of engineering biology. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2008;24(17):1827-36.

- [41] Perry SW, Burke RM, Brown EB. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research. *Annals of biomedical engineering*. 2012;40(2):277-91.
- [42] Sabino DMU, da Fontoura Costa L, Rizzatti EG, Zago MA. A texture approach to leukocyte recognition. *Real-Time Imaging*. 2004;10(4):205-16.
- [43] Sarkar A, Sharma K, Sonak RV. A new approach for subset 2-D AR model identification for describing textures. *Image Processing, IEEE Transactions on*. 1997;6(3):407-13.
- [44] Sugiyama M, Saitou T, Kurokawa H, Sakaue-Sawano A, Imamura T, et al. Live imaging-based model selection reveals periodic regulation of the stochastic G1/S phase transition in vertebrate axial development. *PLoS computational biology*. 2014;10(12):e1003957.
- [45] 高松哲郎. バイオイメージングがわかる: 細胞内分子を観察する多様な技術とその原理: 羊土社; 2005.
- [46] Thomas G, van Voskuilen J, Gerritsen HC, Sterenborg HJ. Advances and challenges in label-free nonlinear optical imaging using two-photon excitation fluorescence and second harmonic generation for cancer research. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2014;141:128-38.
- [47] Tilbury K, Hocker J, Wen BL, Sandbo N, Singh V, et al. Second harmonic generation microscopy analysis of extracellular matrix changes in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(8):086014.
- [48] Uchida S. Image processing and recognition for biological images. *Development, growth & differentiation*. 2013;55(4):523-49.
- [49] Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008;452(7187):580-9.
- [50] Werkmeister E, de Isla N, Netter P, Stoltz JF, Dumas D. Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy. *Photochemistry and photobiology*. 2010;86(2):302-10.
- [51] Wu S, Huang Y, Li H, Wang Y, Zhang X. Quantitative analysis on collagen of dermatofibrosarcoma protuberans skin by second harmonic generation microscopy. *Scanning*. 2015;37(1):1-5.
- [52] Yasui T, Tohno Y, Araki T. Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry. *Journal of biomedical optics*. 2004;9(2):259-64.
- [53] Zucker SW. Toward a model of texture. *Computer Graphics and Image Processing*. 1976;5(2):190-202.

齋藤 卓 (正会員) 〒791-0295 愛媛県東温市志津川

2009 年, 筑波大学大学院数理物質科学研究科博士後期課程修了, 理学博士. 現在, 愛媛大学医学部附属病院先端医療創生センター助教. 日本応用数理学会, 日本発生生物学会, 会員. 数理科学を利用したバイオイメーキング画像の解析に興味を持つ.

清松 悠 (非会員) 〒791-0295 愛媛県東温市志津川

2015 年, 愛媛大学大学院医学系研究科博士課程修了, 医学博士. 現在, 愛媛大学大学院医学系研究科整形外科学助教. 日本整形外科学会, 日本手外科学会, 日本マイクロサージャリー学会, 日本人工関節学会, 会員. 日本整形外科学会専門医.

大嶋 佑介 (非会員) 〒791-0295 愛媛県東温市志津川

2010 年, 青山学院大学大学院理工学研究科博士後期課程修了, 理学博士. 現在, 愛媛大学大学院医学系研究科助教. レーザー学会, 応用物理学会, 日本分子生物学会, 日本がん分子標的治療学会, 会員. 非線形光学イメーキングの医療応用研究に従事.

今村 健志 (非会員) 〒791-0295 愛媛県東温市志津川

1993 年, 鹿児島大学大学院医学研究科博士課程単位取得後退学, 医学博士. 現在, 愛媛大学大学院医学系研究科分子病態医学講座教授. 日本癌学会監事. 日本がん分子標的治療学会理事. 日本骨代謝学会評議員. がん, 骨代謝とバイオイメーキングに興味を持つ.