

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「計測技術と高度情報処理の融合による
インテリジェント計測・解析手法の開発と応用」
研究課題「一細胞ラマン計測と情報科学の融合
による細胞診断の迅速解析技術の開発」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月
(追加支援により、2023年3月まで延長)

研究代表者：小松崎 民樹
(北海道大学電子科学研究所附属社会創
造数学研究センター 教授・化学反応創成
研究拠点WPI-ICReDD 主任研究員)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究課題では、シグナル対ノイズ比が低いラマン分光イメージングに基づいて、すべての波数成分を均一に復元するのではなく、細胞状態(例:がん/非がん、病変)の判定精度を復元しつつ計測と識別がインタラクティブに働く迅速化技術を開発し、医療診断に向けた生命科学におけるイノベーション創出を目的とした。**情報科学・統計数理グループ**は、他のグループと連携しながら、ラマン装置や異なる実験条件に由来するスペクトル差を低減させる新しい標準化手法を開発し、細胞の形態情報による診断が困難とされる甲状腺濾胞癌細胞株/甲状腺濾胞上皮細胞株の系統的情報解析、ポリ-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 (PAMPS)ハイドロゲル上におけるがん細胞の再プログラミング現象の「その場(*in situ*)」解析を可能とした。アンサンブル学習に基づいて甲状腺濾胞癌細胞株/甲状腺濾胞上皮細胞株に対するがん指標、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)の進行度を定量する識別子を開発した。「探索」と「それまで獲得した知識活用」をバランス良く選択することで、できるだけ少ない試行回数で設定した問題を所望の精度で識別する多腕バンディット手法をラマン計測に応用した。診断精度を保証したラマン迅速計測のアルゴリズム(悪腕存在チェック問題)等を新たに開発し、**装置開発グループ**と共同で、同期システムの最適化等を組み込んだプログラマブル迅速ラマン計測装置を構築した。計測に適した改良を加えながら、甲状腺濾胞癌細胞株/甲状腺濾胞上皮細胞株に対する数値シミュレーションでは、点スキャン型およびラインスキャン型ラマン分光装置に比べて、 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 倍および $20 \sim 10^2$ 倍(照射ショット数比較)、診断精度を保持したまま迅速化できることを明らかにした。また、ポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)ビーズおよびポリスチレン(PS)ビーズを“がん”、“非がん”に見立てたビーズ混合系の概念実証(POC)ラマン迅速計測を行い、ラインスキャン型ラマン分光装置に比して照射ショット数比較で約 19 倍、迅速診断することに成功した。さらに、1 次元方向のみに照射位置を変化させて、スリット共焦点効果による効率的な背景光除去も取り入れたバーコードバンディットラマンシステムも開発した。これらは計測×情報の融合によって得られた計画以上の成果である。**細胞診断グループ**は、甲状腺濾胞がんの細胞診のプロトタイプとして、正常な甲状腺濾胞上皮細胞株と甲状腺濾胞癌由来細胞株の共培養系等を開発した他、**装置開発グループ**と共同で、細胞・組織判別のための狭帯域幅・低波数分解能スペクトル計測条件を明らかにし、より高精度な測定データの校正方法を開発した。また、**情報科学・統計数理グループ**と共同で、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)において組織形態の異常が顕在化するよりも早く、ラマン分光イメージングから非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)への移行を超早期に診断できることをラットモデルで明らかにした。また、ラマン画像から脂肪滴および星細胞分化転換のマーカーであるレチノール量を解析し、甲状腺がん細胞における細胞内脂肪滴の定量、形成メカニズム、生物学的意義の探索を行った。**信号再構成グループ**では、圧縮計測されたラマン画像から必要な信号情報に特化した再構成を実現するため、新しい正則化の開発および効率化に向けた最適化アルゴリズムの改良を行った。外れ値を露わにスパースノイズとして考慮に入れたスペクトル再構成手法、空間-波長両方に内在するスパース性・スムーズ性を数理的に仮定した混合正則化手法を開発し、その有用性を明らかにした。また、**情報科学・統計数理グループ**と**装置開発グループ**が共同で、時間的に変動するラマン分光イメージングを再構成するアルゴリズムを開発し、数値シミュレーションによりその有用性を実証した。1 年追加支援期間中、これまでに完成させたプログラマブル照明とアルゴリズムを実装したオン・ザ・フライラマン装置と同一試料のラインスキャンラマン画像に基づくシミュレーションを実施し、実験と理論の整合性を実証した。分類バンディット問題におけるサンプル数が漸近的最適性をもつアルゴリズムを開発し、汎用ソルバーと比して計算時間を約 1/1000 に短縮することに成功した。また、バーコードバンディットシステムの実

用化を目的とし、論文化や特許化のために、非アルコール性脂肪肝疾患以外に、肝細胞・胆管細胞混合試料の薬剤応答など応用する対象となる生体試料の検討をおこなった。甲状腺濾胞癌細胞種の癌指標として、細胞質における脂肪滴に着眼し、脂肪滴と脂肪滴関連タンパクであるアディポフィリンの共局在を定量し、甲状腺濾胞癌検出の新たなバイオマーカーになりうることを見いだした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要: 計測と識別がインタラクティブに働くオンライン最適化技術による迅速化アルゴリズムを開発し(Mach. Learn. 2020, PAKDD 2021, AISTATS2023)、北大と阪大で共同特許出願し、on-the-fly Raman microscope 試作機を完成させた。最適な照射パターンを計測毎に装置系にフィードバックする計測手法は分光計測一般に対し成立し、種々の分光計測への応用が期待される。計測介入型 AI に基づく精度保証付き迅速計測を実現した研究はこれまでにない。日本人受賞者が不在の FACSS SciX2021 のイノベーション賞の最終選考 3 件に選出された。

2.

概要: 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は 4 大肝疾患のうちのひとつであり、予後の悪い非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の早期診断が期待されている。ラットを用い、形態異常が肝組織に顕在化するまえに、非アルコール性単純性脂肪肝 (NAFL) は NASH にラマンスペクトル特性が酷似する NAFL- β と正常肝のそれに酷似する NAFL- α に大別され超早期診断の可能性が高いこと、などを明らかにした (FEBS Lett. 2023)。また、ラマン分光画像から NASH の度合いを定量するための解析手法を北大、阪大、京都府立医大で共同特許出願した。

3.

概要: 用いる分光計測装置の違い、測定条件の僅かな差違を低減する高精度なラマン校正手法を新規に開発した。特に、細胞の形態情報に差違がなく分光スペクトルの差違も相対的に小さい場合、これらの手法が標準化されるものと期待される。ラマン組織学として細胞内の化学的性質が似ているクラスター分布を“記述子”として新規提案し、その有用性を示す (Taylor ら JPCB 2019; Helal ら FEBS Lett. 2019, Halim ら Analyst 2023) とともに、細胞分析・判別の高速化のための狭帯域・低波数分解能ラマン顕微鏡法を開発した (熊本ら JPCB 2019)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要: 計測に適したアルゴリズム改良を施したバンディット手法の枠組みを用いた情報計測技術は、目的に応じて与えられるラマン識別子の種類に、原則、依存しないため、最適な照射パターンを計測毎に装置系にフィードバックする計測手法は分光計測一般に対して成立する。また、圧縮センシングのように背後のデータ数理構造 (スパース性) を仮定する必要がないため、種々の分光計測への応用が期待される。現在、ナノフoton、堀場製作所などが興味を示している。また、バーコードバンディットラマンシステムは特許出願予定である。

2.

概要: バンディット手法はできるだけ少ない試行回数で設定した問題を所望の精度で識別するものであるが計測系への応用例は国内外含めて例をみない。計測と情報の融合を駆動す

るバンディット手法の水平展開として、フローサイトメトリーに隣がんハエモデルの幼虫を流しながら蛍光観察し、開発したバンディット手法を応用することで、効率的に薬剤効能の高い薬剤を迅速にスクリーニングするプロジェクトを立ち上げた (AMED、JST/大学発新産業創出プログラム START)。

3.

概要:非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は治療法の確立が待たれる 4 大肝疾患のひとつである。蛍光染色による形態観察はラマン分光イメージングに比して時間を多く要するだけでなく、形態情報以外の情報が取得できない。そのため、非アルコール性脂肪性肝疾患(NASH)の早期診断がラマン分光イメージングにより実現できれば、その効果は計り知れない。まだ、マウス、ヒトでの検証が必要であるが、JST 成果展開シーズ技術調査でも実応用が高く期待されている。バーコードバンディットラマンシステムでの迅速計測を計画している。

<代表的な論文>

1. Koji Tabata, Atsuyoshi Nakamura, Junya Honda, Tamiki Komatsuzaki, “A bad arm existence checking problem: How to utilize asymmetric problem structure?”, **Mach. Learn.** **109**(2),327-372(2020).

概要:集合の中に不良のものが含まれているか否かを高速に判定する問題を「悪腕存在チェック問題」として定式化した。提案アルゴリズムに対し、与えられた許容誤診断率の範囲内で正しい判定を行うためのサンプル数の期待値の上界を与えた他、類似問題用に開発された既存アルゴリズムよりも少ないサンプル数で停止することを明らかにした。本論文の結果はラマン分光による高速がん診断システムの逐次計測点設計 (AISTATS2023, PNAS revise 中)のベースとなっており、基本的な部分は国内特許出願した。

2. K.M. Helal, J. N. Taylor, H. Cahyadi, A. Okajima, K. Tabata, Y. Itoh, H. Tanaka, K. Fujita, Y. Harada, T. Komatsuzaki, “Raman Spectroscopic Histology Using Machine Learning for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease” **FEBS Lett.** **593**(18) 2535-2544(2019)

概要:情報理論における速度歪み理論と画像解析に用いられるスーパーピクセル法を併せることで、低いシグナル対ノイズ比のラマン分光画像の空間情報をできるだけ保持しつつシグナル対ノイズ比を増大させる情報解析手法を開発し、非アルコール性脂肪性肝疾患の病理状態をラマン分光画像から識別できることを明らかにした(Editor's Choice、表紙カバーに選出)。

3. J. Taylor, K. Mochizuki, K. Hashimoto, Y. Kumamoto, Y. Harada, K. Fujita, T. Komatsuzaki "High Resolution Raman Microscopic Detection of Follicular Thyroid Cancer Cells with Unsupervised Machine Learning" **J. Phys. Chem. B** **123**, 4358-4372 (2019)

概要:細胞および細胞核の形態情報による病理細胞診断が困難とされている甲状腺濾胞癌細胞株、甲状腺濾胞上皮細胞株のラマン分光画像に対し各細胞のラマンスペクトルの期待値を用いた分類では 78%の精度であるのに対し、90%の精度で識別する 8 次元のラマンクラスター分布識別子を導出した。ラマンクラスター分布とは速度歪み理論を用いて、細胞内に含まれるラマンスペクトルが似ているもの同士をクラスターとしてまとめ、細胞毎に同定される各クラスターの存在確率分布を意味する。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「情報科学・統計数理」グループ

研究代表者: 小松崎 民樹 (北海道大学電子科学研究所附属社会創造数学研究センター 教授・北海道大学化学反応創成研究拠点 WPI-ICReDD 主任研究員)

研究項目

- ・Rate-Distortion 理論等に基づくシグナル／ノイズ比の低い高次元特徴空間に基づく細胞診断のための特徴量抽出技術の開発
- ・スパース学習によるがん／非がん細胞の識別規則の探索
- ・ラマン画像データの標準化手法の開発
- ・バンディット手法によるがん／非がん細胞の識別規則の探索
- ・計測と識別がインタラクティブに働くオンライン最適化技術による迅速化
- ・符号化開口によるスパース学習による迅速化

② 「装置開発」グループ

主たる共同研究者: 藤田 克昌 (大阪大学大学院工学研究科 教授)

研究項目

- ・原理検証用装置の開発
- ・高速化・蛍光観察を実装したプロトタイプ機の開発
- ・スパースセンシングによる高速化
- ・アプリケーション/オンライン最適化技術による改良
- ・凍結試料を用いた診断への適用

③ 「細胞診断」グループ

主たる共同研究者: 原田 義規 (京都府立医科大学大学院医学研究科 准教授)

研究項目

- ・細胞・組織のラマン分光計測条件の検討
- ・ラマンスペクトルに基づいた細胞状態の定義と悪性度の評価
- ・がん・非がん細胞の共培養系の確立、飢餓状態などの異なる環境下でのラマン顕微鏡

観察

④ 「信号再構成」グループ

主たる共同研究者: 小野 峻佑 (東京工業大学情報理工学院 准教授)

研究項目

- ・対象とする画像の種別を制限した正則化・アルゴリズム設計などの開発
- ・非ガウス性のノイズやモデルエラーにロバストなデータ項・制約条件の開発
- ・ハイパースペクトル用の正則化をベースにラマンスペクトルの構造に特化した正則化の開発
- ・乱択最適化を取り入れた高速かつ高効率な圧縮センシングに基づくラマンデータ再構成アルゴリズムの開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

中村篤祥教授、小野峻佑准教授(前さきがけ研究者)は、新学術領域「シンギュラリティ生物学(2018年10月発足)」計画班(研究代表者:小松崎民樹)にも、研究分担者として参画し連携強化している。埼玉大学さきがけ研究者松永康佑准教授には、北海道大学電子科学研究所、東北大学多元物質科学研究所、東京工業大学化学生命科学研究所、大阪大学産業科学研究所、九州

大学先導物質化学研究所から成るネットワーク型共同研究拠点の基盤研究課題「生体分子ダイナミクスのマルコフ状態モデルを構築するための効率的な構造サンプリング手法の開発」に共同研究申請いただいております、年に数回バンディット手法の計算科学応用に関する意見交換を行っています。また、東京大学理学部さきがけ研究者 平松光太郎助教は過去計 4 回 CREST 内合同会議に参加・招待講演してもらっており、ラマン計測に関わる意見交換を行っています。

鷲尾隆教授の CREST チーム、「次世代フォトニクス」領域永井健治教授の CREST チームと 2019 年 3 月 1-3 日、2017 年 3 月 18-20 日と合宿形式の合同会議を実施し、領域を越えた連携を図っており、2018 年 10 月発足の新学術領域「シンギュラリティ生物学」につながった。当該新学術領域では、免疫系とがん細胞のあいだの競合関係の情報解析や情報理論的因果推論の研究を展開しており、当情報計測領域の知見が活かされている。

臨床関係では、小松崎は 2018 年 10 月発足の北海道大学化学反応創成研究拠点(WPI-ICReDD)においてバンディット手法によるがん幹細胞と分化したがん細胞に対する迅速薬剤スクリーニングの共同研究を医学部病理学講座田中伸哉教授と実施し、本領域で開発した *in situ* ラマン解析手法を適用し、未分化のがん幹細胞に着眼した情報計測解析を展開し、がん幹細胞と分化がん細胞を識別するラマン信号の同定に成功している。研究分担者原田は、非アルコール性脂肪性肝疾患の早期診断、肝線維化発生機序に関する共同研究を京都府立医科大学消化器内科伊藤義人教授と、術中蛍光イメージングに関する共同研究を京都府立医科大学消化器外科大辻英吾教授、医学フォトニクス講座高松哲郎教授と展開している。また、低分子化合物等を用いた形質転換に関する共同研究を京都府立医科大学細胞再生医学戴平研究教授、東京医科大学先端核酸医療講座村上善基教授と展開している。

小松崎は、2017 年 9 月に DSAA2017 – The 4th IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics“Special Session on Advanced Informatic Measurement using Statistics, Machine Learning and Pattern Recognition (AimSMLPR)” の Program Committee を担当した。2018 年 4 月に人工知能学会第 2 種研究会 計測インフォマティクス研究会 (Special Interest Group on Measurement Informatics: SIG-MEI)の本 CREST 領域の鷲尾隆教授とともに立ち上げ幹事を担当し、2021 年 6 月から「情報計測オンラインセミナーシリーズ 数理・情報科学×計測科学の高度融合による新展開」の情報計測オンラインセミナーシリーズ運営副委員長を務めている。国際会議 Pacific-Asia Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, Workshop on Machine Learning for MEasurement Informatics を鷲尾隆教授とともに主催した。計測科学と数理・情報科学の高度融合の重要性を広く説明するため、日本学術会議公開シンポジウム「次世代統合バイオイメージングと数理の協働の展望(2020 年 3 月 23 日→令和 2 年 10 月 14 日、コロナ禍による順延)」(<http://www.scj.go.jp/ja/event/2020/291-s-1014.html>)を小松崎が共同企画・立案、オンライン開催し、当該領域からは北川源四郎先生、鷲尾隆先生にご登壇いただいた(参加登録 232 名、実際の参加者総数約 160 名)。

藤田は、第 43 回、第 44 回レーザー顕微鏡研究会 講演会・シンポジウム(それぞれ、2018 年 1 月 19 日、2019 年 7 月 4,5 日)を主催し、光学顕微イメージングについての最新技術を学問分野、業界を問わず交換し、分野の活性化を図った。特に、2019 年は計算科学、ビッグデータと顕微鏡技術に関するシンポジウムを開催し、計測と解析との融合が拓く新しい光学顕微鏡技術について議論した。また、国際シンポジウム Biomedical Raman Imaging 2019(<https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/bri/>) (2019 年 11 月 24-26 日)を主催した。世界各国からラマン分光イメージング技術とその生体医用応用の研究をリーディングする招待講演者を 15 名程度集め、最新の研究成果の共有と今後の展望について議論した。Nature 姉妹紙の Editor 複数名とともにパネルディスカッションをおこない、様々な視点からの技術展望を参加者で共有した。このシンポジウムはシリーズ化され、2022 年にアトランタ、2024 年にグラスゴーでの開催を予定している。

Biomedical Raman Imaging 2019 を通じて Thomas Bocklitz 博士 (Leibniz Institute of Photonic Technology、独)、Ioan Notinger 教授 (RSC、University of Nottingham、英)と「ラマン分光計測における標準化手法の統一とオンライン計測」に関する国際共同研究を開始し Analyst 2023, Analytical Chemistry (revise 中)などの成果を出した。

国際強化支援プログラムを通して Wei Min 教授 (コロンビア大学、米)との共同研究を開始した。

同教授が先進的に進める誘導ラマン散乱顕微鏡による生体イメージング技術を導入し、高速なラマン診断技術の開発に繋げる。2019年10月から2020年3月まで博士後期課程学生がMin教授の研究室に滞在し誘導ラマン散乱顕微鏡技術について学んだ。

産業界との連携に関しては2020年12月9～11日オンサイト開催『nano tech 2021 第20回 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議』(<https://www.nanotechexpo.jp/main>)でポスター展示、2019年度、2020年度 JST 成果展開シーズ技術調査面談等を積極的に実施し、今後の社会実装に向けたテーマの絞り込み等を検討した(最終的に、非アルコール性脂肪肝疾患の迅速ラマン診断を最初の生体試料サンプルとして設定したのは、2020年度 JST 成果展開シーズ技術調査面談に基づいている)。悪腕存在チェックバンディット手法により、照射パターンをオンライン制御する on-the-fly Raman microscope に関しては、現在、ナノフoton株式会社および堀場製作所が興味を示している。今後、JST/A-STEP 等へ社会展開に向けた申請を計画している。開発したバンディット情報計測アルゴリズムの水平展開として、効率的にがん治癒率の高い薬剤を迅速スクリーニングするプロジェクトを新規に開始した(AMED、JST/大学発新産業創出プログラム START)。

藤田がプロジェクトリーダーを務める JST 共創の場形成支援プログラム(育成型)においては、細胞分析が主要な研究開発課題と設定されており、参画企業、大阪大学大学院医学系研究科、同薬学研究科と細胞成熟度の無標識分析を進めている。高速な無標識細胞分析技術の確立のため、本 CREST プロジェクトで開発した技術を組み込む予定である。