

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22969

研究課題名（和文）因果関係に基づいたラマン分光学的組織判別法の創出

研究課題名（英文）Histological discrimination by Raman spectroscopy based on causal relationship

研究代表者

南川 丈夫（MINAMIKAWA, Takeo）

徳島大学・ポストLEDフォトリクス研究所・准教授

研究者番号：10637193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：現在のがん手術では、がんの全摘除のみならず、末梢神経の温存手術による術後の患者のQOLの改善も重要な課題となっている。そこで本研究では、ラマン散乱分光法による組織観察法を基盤に、入力データ、スペクトル処理、組織判別の因果関係を活用して、最適化された科学的根拠（物理的に意味のある特徴量）に基づいた末梢神経およびその周囲組織の選択的判別法の開発を行った。特に、判別根拠に基づく機械学習最適化アルゴリズムを開発し、組織判別根拠となる特徴量を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の機械学習を用いた分光学的組織判別法では、入力データの処理層においてもは人間には理解できない（物理的に理解ができない）情報処理が施されてしまっていた。そのため、情報処理の科学的根拠がわからないという点で、患者の命に関わる医療機器への適用には非常に高いリスクを伴う。本研究では、判別分析における因果関係に着目することで科学的根拠を明らかにしうる新たなラマン分光学的組織判別法を実現した点に学術的意義がある。本研究がさらに展開されることで、科学的根拠に基づく神経温存手術の実現が期待され、医学的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In recent cancer surgery, not only the total resection of malignant lesions but also the improvement of postoperative QOL of patients by peripheral nerve-sparing surgery is a crucial issue. This study proposed the selective detection method of peripheral nerves against adjacent tissues by utilizing the causal relationship of input data, spectral processing, and tissue discrimination results of Raman spectroscopy. Especially, we developed a machine learning optimization algorithm based on the evidence of tissue discrimination and clarified the features that are the basis of tissue discrimination.

研究分野：顕微分光学

キーワード：ラマン散乱分光法 末梢神経 神経温存手術 機械学習

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、日本人の死因の第一位であり、死因の約3割を占めている。その治療の柱のひとつとして外科的摘出術が行われているが、その術中に悪性腫瘍周辺の組織に存在する末梢神経が摘出されたり傷ついたりすることによって温存できず、術後に後遺症を残す症例が数多く報告されている。そのため、術者自身の目では観察困難な細い末梢神経を可視化する技術が求められている。

従来、細い末梢神経の位置を判断するために、色素を用いた染色技術が改良されてきたが、染色自体がヒトに対して有害であることが多く、術中観察に使用することは困難である。そのため、現在術中に細い末梢神経の位置を判断する技術は存在せず、神経の位置は解剖学的知識、つまり術者の経験に頼らざるを得ない状況がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、研究代表者らがこれまで行なってきたラマン散乱分光法による組織観察法を基盤に、入力データ、スペクトル処理、組織判別の因果関係を活用して、最適化された科学的根拠(物理的に意味のある特徴量)に基づいた末梢神経およびその周囲組織の選択的判別法の実現を目的とする。そのために、判別根拠に基づく機械学習最適化アルゴリズムを開発し、ラマンスペクトルデータから組織判別根拠の効果的抽出、組織判別能の最大化を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、主に下記の3点について実施した。

- (1) 組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムの開発
- (2) 科学的根拠を明示する機械学習アルゴリズムの判別能の評価と判別基準の解明

4. 研究成果

(1) 組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムの開発

本研究では、ラマン散乱分光法で得られるラマンスペクトルと、ラマンスペクトルを用いた生体組織判別分析による判別結果の因果律を利用することで、ラマンスペクトルに現れる組織判別に重要な特徴量の抽出法を開発した。

ラマン散乱分光法は、光が組織や細胞を構成する分子の分子振動と相互作用することで生じるラマン散乱光を利用した分光法である(図1)。光を試料に照射した場合、一部の光は波長シフトを伴って散乱される。この波長シフトを伴う散乱がラマン散乱である。ラマン散乱光の波長シフト量は、分子振動のエネルギーに依存する。この分子振動は、分子を構成する原子の種類や結合の仕方などによって鋭敏に変化する。そのため、ラマン散乱光の波長シフト(ラマンスペクトル)を解析することで、分子振動を介した組織や細胞の分子情報の推定が可能となる。しかし、ラマンスペクトル自体は、励起光を照射した焦点に存在する様々な分子の分子振動のアンサンブル平均として得られる。そのため、このラマンスペクトルから、必要な情報をいかに抜き出し、分子組織診断につなげるかが肝要である。

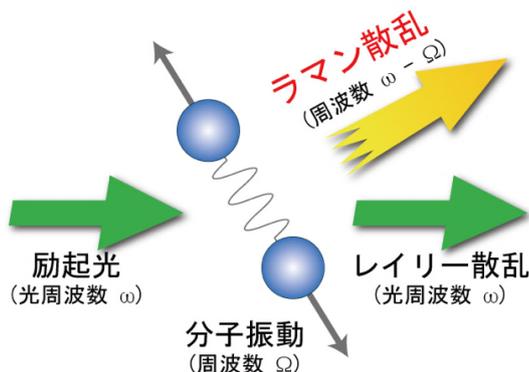


図1 ラマン散乱分光法

まず、主成分分析法を用いた特徴量抽出法を開発した。主成分分析法を用いた特徴量抽出法では、まずラマン散乱分光法により、既知の組織のラマンスペクトル群(トレーニングデータセット)を取得する。得られたトレーニングデータセットに対し、主成分分析を行い、主成分スペクトルと主成分スコアを取得する。得られた主成分スコアを用いて判別分析を行い、組織の判別能を評価する。その際、上位の主成分すべてを使用した場合の組織判別結果と、そこから一部の主成分を削減した場合の組織判別結果を比較する。この時、判別結果に大きな差異が生まれれば、削除した主成分が重要な組織判別という観点で重要な意味を持つと考えることができる。

次に、サポートベクターマシンを用いた特徴量抽出法について検討した。サポートベクターマシンは、1995 年頃に提案された教師あり学習を用いる分類問題や回帰問題に適用可能なパターン認識モデルの 1 つである。サポートベクターマシンでは、図 2 に示す赤と青のクラスからもっとも近いベクトルを 1 点ずつ選ぶ。その 2 点の間の距離をマージンと言う。サポートベクターマシンを用いた組織判別は、このマージンの距離を最大にする「マージン最大化」という考え方に基づいて判別基準を定める方法である。サポートベクターマシンによる組織判別は、2 クラス間の距離が大きいほど誤分類が少なくなり、判別精度が向上する。即ち、図 3 のように特徴量(次元)を 1 つ減らしたとき、そのマージンの減少量が大きいほど、削除した特徴量が判別精度という観点で重要と考えられる。この考え方を利用することにより、組織の判別に重要な特徴量を推定することが可能である。

以上のことから、主成分分析法およびサポートベクターマシンを用いることで、組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムを構築できることが明らかとなった。さらに、本研究で開発した手法と同様の手法を用いることで、他の機械学習アルゴリズムでも同様の組織判別に重要な特徴量を抽出することができることも明らかにした。

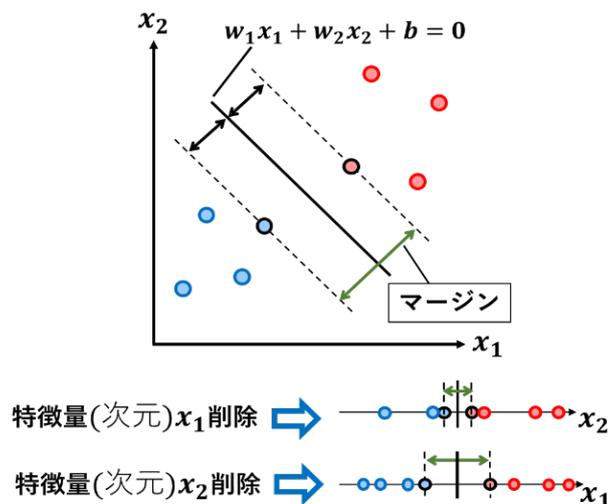


図 2 サポートベクターマシンによる組織判別と重要な特徴量の推定方法

(2) 科学的根拠を明示する機械学習アルゴリズムの判別能の評価と判別基準の解明

開発した組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムを用いて、組織判別能の評価と判別基準の解明を行った。

まず、主成分分析法を用いた組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムについて評価した。本研究では、サンプルに神経組織（有髄神経、無髄神経）および周辺の非神経組織（脂肪組織、骨格筋、膠原組織）を用いて、主成分分析法を用いた特徴量抽出法の有効性について検討した。図 3 に各組織 1,000 スペクトル（合計 5,000 スペクトル）を用いて主成分分析を行って得られた、寄与率の高い上位 5 個の主成分スペクトルを示す。本研究では、これらの主成分を複数個削減することによる判別結果の変化から、組織判別という観点で重要なラマンスペクトルについて明らかにした。例えば、主成分 1~20 まですべてを使用した場合、無髄神経の判別精度は 99.0%であった。一方、それらのうち、主成分 1, 主成分 6, 主成分 9, 主成分 10 を削減した場合、判別精度は 63.6%に減少した。この時、他の組織の判別精度の顕著な減少は見られなかった。即ち、主成分 1, 主成分 6, 主成分 9, 主成分 10 の組み合わせが、無髄神経を判別する上で重要なラマンスペクトルを保有していることが明らかである。この例以外にも、各組織の特徴を同様の手法で明らかにできる事がわかった。

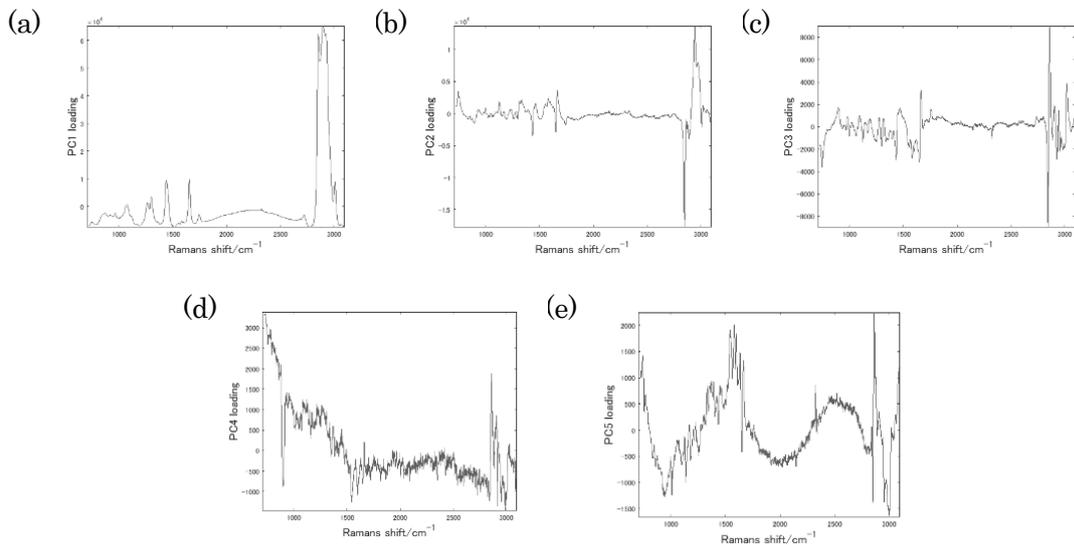


図3 主成分分析により得られた主成分スペクトル. (a)主成分スペクトル1, (b)主成分スペクトル2, (c)主成分スペクトル3, (d)主成分スペクトル4, (e)主成分スペクトル5.

次に、サポートベクターマシンを用いた組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムについて評価した. 本研究では、サンプルに神経組織（有髄神経，無髄神経）および周辺の非神経組織（脂肪組織，骨格筋，膠原組織）を用いて、サポートベクターマシンを用いた特徴量抽出法の有効性について検証した. 各組織から得た1,000ラマンスペクトル（合計5,000スペクトル）を用いて、サポートベクターマシンにより有髄神経のラマンスペクトル重要度を評価した一例を図4に示す. この時、ラマンスペクトルの各波数の強度を特徴量とした. その特徴量を1つずつ削除した際のマージンの変化量に着目し、組織判別における特徴量の重要度の評価を行った. その結果、マージン減少量が大きくなる特徴量を明らかにすることに成功した. 図4で示したマージン減少量が大きな末梢神経のラマンバンドの分子帰属としては、フェニル基振動モード (1000 cm^{-1})、 CH_2 変角振動モード (1440 cm^{-1})、 $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動モード (1655 cm^{-1}) などが考えられる. これらのラマンスペクトルが、サポートベクターマシンによる組織判別の根拠の一部となっていると考えられる.

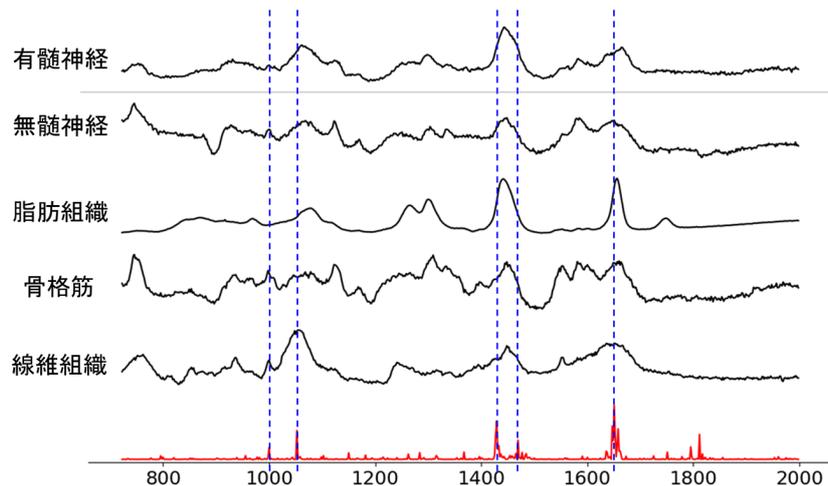


図4 サポートベクターマシンによるラマンスペクトル重要度評価.

黒線，平均ラマンスペクトル. 赤線，相対マージン減少量.

以上のことから、主成分分析法やサポートベクターマシンを用いることで、組織判別に重要な特徴量を抽出する機械学習アルゴリズムを構築可能であることが明らかとなった. また、この組アルゴリズムに基づき明らかとなった重要度の高いラマンバンドに対してラマン分光計測を最適化することで、効率的な組織判別のためのラマン分光計測が可能であることが明らかとなった. さらに、実際の組織判別へ適用することで、組織判別に対する重要な基準について解析可能であることが明らかとなった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 南川 丈夫	4. 巻 68
2. 論文標題 術中医療診断を目指したラマン散乱分光法-分子振動に基づく新たな無染色組織分子診断法-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 分光研究	6. 最初と最後の頁 142-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minamikawa Takeo, Ichimura-Shimizu Mayuko, Takanari Hiroki, Morimoto Yuki, Shiomi Ryosuke, Tanioka Hiroki, Hase Eiji, Yasui Takeshi, Tsuneyama Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular imaging analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplets in non-alcoholic fatty liver disease by Raman microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18548-18548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75604-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 8件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 谷岡 弘規, 南川 丈夫, 清水 真祐子, 森本 友樹, 高成 広起, 塩見 涼介, 長谷 栄治, 安井 武史, 常山 幸一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎診断に対するラマン顕微鏡法の適用可能性の検証
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 広志郎, 南川 丈夫, 寺尾 圭貴, 獅々堀 正幹, 安井 武史
2. 発表標題 ラマン分光法とSVMを組み合わせた末梢神経の選択的判別と判別根拠の推定
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀 広志郎, 南川 丈夫, 寺尾 圭貴, 獅々堀 正幹, 安井 武史
2. 発表標題 ラマン分光法とSVMを用いた末梢神経の選択的判別における判別根拠の推定
3. 学会等名 LED総合フォーラム in 徳島
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷岡 弘規, 南川 丈夫, 清水 真祐子, 森本 友樹, 高成 広起, 塩見 涼介, 長谷 栄治, 安井 武史, 常山 幸一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の蓄積した脂肪に着目したラマン分光イメージング
3. 学会等名 LED総合フォーラム in 徳島
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺尾 圭貴, 南川 丈夫, 安井 武史
2. 発表標題 主成分分析を駆使したラマン散乱分光法による神経組織判別及びその判別根拠の解明
3. 学会等名 LED総合フォーラム in 徳島
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南川 丈夫
2. 発表標題 ラマン散乱分光法による生体組織機能情報の可視化
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第41回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 ラマン散乱分光法で実現する生体機能診断
3. 学会等名 さがけ（光極限）公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 分光学を駆使した新たな医療診断～組織機能を可視化する～
3. 学会等名 バイオインダストリー協会未来へのバイオ技術勉強会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 がんの統合的診断・治療を目指した分子から組織のマルチスケール・バイブレーション光学顕微鏡の創成
3. 学会等名 徳島大学研究クラスターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 分光学を駆使した新たな医療診断～組織機能を可視化する～
3. 学会等名 第20回日本光学会情報フォトンクス研究グループ研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 分光学に基づくヒトに優しい医療センシング
3. 学会等名 日本実験力学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 医療応用を目指したラマン散乱分光法 ~分子振動に基づく新たな無染色組織診断法~
3. 学会等名 ものづくりライフイノベーションシンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南川丈夫
2. 発表標題 ラマン散乱分光法を用いた無染色分子組織診断
3. 学会等名 第58回 日本生体医工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeo Minamikawa, Mayuko Ichimura-Shimizu, Hiroki Takanari, Ryosuke Shiomi, Hiroki Kusaka, Hiroki Tanioka, Eiji Hase, Takeshi Yasui, and Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Molecular imaging analysis of accumulated fats in non-alcoholic steatohepatitis by Raman microscopy
3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2020 (APASL 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeo Minamikawa, Yoshiki Terao, Ryosuke Shiomi, and Takeshi Yasui
2. 発表標題 Multivariate spectral analysis for identification of spectral features of peripheral nerves using Raman microspectroscopy
3. 学会等名 Quantitative BioImaging Conference (QBI 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeo Minamikawa, Tsunehisa Yamamoto, Yoshinori Harada, Yoshihisa Yamaoka, Hideo Tanaka, Hitoshi Yaku, and Tetsuro Takamatsu
2. 発表標題 Raman spectroscopic evaluation of human myocardial infarction
3. 学会等名 CLEO/Europe-EQEC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Shiomi, Takeo Minamikawa, Ryo Oe, Ittetsu Taniguchi, Takeshi Yasui, and Hirofumi Ohta
2. 発表標題 Comparative analysis of cultivation method for matcha green tea leaves by label-free multimodal microspectroscopy
3. 学会等名 European Conferences on Biomedical Optics (ECBO 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeo Minamikawa, Tsunehisa Yamamoto, Yoshinori Harada, Yoshihisa Yamaoka, Hideo Tanaka, Hitoshi Yaku, and Tetsuro Takamatsu
2. 発表標題 Label-free evaluation of human myocardial infarction using Raman spectroscopy
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2019 (FOM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 圭貴, 南川 丈夫, 塩見 涼介, 水野 孝彦, 安井 武史
2. 発表標題 多変量解析を駆使したラマン散乱分光法による末梢神経判別法の開発
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 圭貴, 南川 丈夫, 塩見 涼介, 水野 孝彦, 安井 武史,
2. 発表標題 多変量解析を駆使したラマン散乱分光法による神経組織判別
3. 学会等名 LED総合フォーラム2020 in 徳島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩見 涼介, 南川 丈夫, 麻植 凌, 谷口 一徹, 安井 武史, 太田 博文
2. 発表標題 ラマン・自家蛍光分光計測を用いた茶葉に与える抹茶製法の影響解析
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会予稿集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 圭貴, 南川 丈夫, 塩見 涼介, 安井 武史
2. 発表標題 多変量解析を駆使したラマン散乱分光法による無染色組織判別
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩見 涼介, 南川 丈夫, 安井 武史
2. 発表標題 分子イメージングのための疑似ライン照射ラマン顕微鏡の構築
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 圭貴, 南川 丈夫, 塩見 涼介, 水野 孝彦, 安井 武史
2. 発表標題 多変量解析を駆使したラマン散乱分光法による無染色組織判別
3. 学会等名 MEとバイオサイバネティックス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学ポストLEDフォトニクス研究所 南川グループWebサイト https://femto.me.tokushima-u.ac.jp/member/minamikawa/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 武史 (YASUI Takeshi) (70314408)	徳島大学・ポストLEDフォトニクス研究所・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------