

平成 30 年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「レーザーアブレーション技術を用いて生体組織の構造解析を高速かつ
低価格で実現するナノレベル3次元構造解析システムの開発」

研究開発成果等報告書

令和元年 5 月

担当局	九州経済産業局
補助事業者	公益財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団
間接補助事業者	株式会社 TCK エルピクセル株式会社

目 次

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制	7
1-3 成果概要	8
1-3-1 レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発	8
1-3-2 レーザーアブレーションシステムの開発	8
1-3-3 3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価	9
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	9
第2章 本論	10
2-1 レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発	10
2-2 レーザーアブレーションシステムの開発	14
2-3 3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価	18
第3章 全体総括	
3-1 研究開発成果	21
3-2 研究開発後の課題	21
3-3 事業化展開	21

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

■研究背景

医療機関での病理診断では、患者より摘出した生体組織や細胞を切片化し、病理標本として観察および診断が行われている。しかし、この切片化は、前処理に約1日、切片作製に2日以上、画像取得に1日以上時間を要し、加えて高度な専門技術が必要である。そのため、必要とされる切片数に対し、対応可能な専任技師が不足している。さらに、2008年日本医師会の「病院における必要医師数調査」によれば、画像取得後に必要となる病理医の不足率は73.5%と、診断する病理医の人手不足も深刻である。また、切片作製においては最も時間を要し、かつ高度な専門技術が必要となる要因は、非常に柔らかい生体組織を刃物によりスライスしなければならないことにある。生体組織の損傷は診断時に得られる情報の欠損につながるため、生体組織を破損させずにスライスすることは非常に難易度が高い。このことが病理医をサポートする臨床検査技師不足の大きな要因となっている。

そこで、これらの作業を短時間かつ低労力で実施できる装置を提供し、医療機関などでの現場が抱える課題の解決を狙う。

本研究開発では、中小企業の特定制品づくり基盤技術の高度化に関する指針の下記課題及びニーズを実現するものである。

(十二)測定計測技術に係る技術に関する事項

1 測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標

(3)川下分野横断的な共通の事項

①川下製造業者等の共通の課題及びニーズ

ア. 高機能化

また、中小企業の特定制品づくり基盤技術の高度化に関する指針に関して、本研究開発はIoT・AI時代に対応した技術指針の改正として改正概要に図1-1の内容で記載されている。

内容	<ul style="list-style-type: none"> ●病理画像診断支援の実現に必要な、ナノレベルの分解能での生体組織の観察を可能とするため、試料スライスから画像取得までを全自動で実施し、レーザーアブレーション（サンプル表面にレーザーを照射することにより照射箇所のマテリアルを削り取る技術）により組織の撮像に伴う損傷を最小限に抑え、対象となる切片画像を短時間で大量に取得する仕組みを開発する。 ●併せて、切片画像から3Dイメージを構築し、構造体の内部まで分かる3次元画像判定用エンジンを開発。さらには、一部ディープラーニングを用いた病理医の診断をサポートする診断支援システムの構築を目指す。 ●電子顕微鏡メーカーであるTCKがレーザーアブレーション技術を用いた撮像装置の開発を担当し、ライフサイエンス領域での画像解析に強みを持つ大学発ベンチャーであるエルピケルが3次元画像判定用のソフトウェア開発を担当。試料提供・アドバイザーの役割で、九州大学・久留米大学の医師も研究開発に参画。
背景	<ul style="list-style-type: none"> ●標本作製から診断まで高度なスキルが要求される病理診断では、対象となる画像数が膨大で、全国に約2,300人（医師全体の1%未満）しかいない病理医をはじめ病理画像診断従事者の作業負担が大きい。
期待される効果	<ul style="list-style-type: none"> ●学会等との連携による臨床研究を経て病理画像診断支援システムの実現を目指し、病理画像診断の標準化・効率化を促進、同分野の発展に大きく寄与することが期待される。

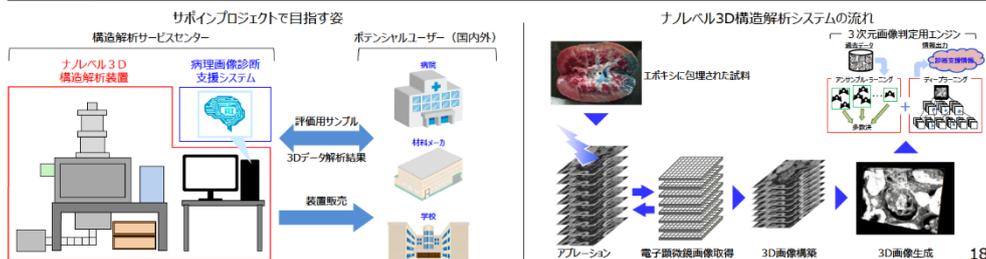


図 1-1 研究開発取組み概要

■研究目的及び目標

はじめに、本研究開発における高度化目標を以下のとおり設定した。

(十二)測定計測技術に係る技術に関する事項

1 測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標

(3)川下分野横断的な共通の事項

②高度化目標

ウ. 評価（分析・解析）の効率性向上

前項の課題を解決するために、本開発ではレーザーアブレーション技術を用いて最小限の生体組織損傷で高速スライス処理し、同時に解析・画像取得を行うという、ナノレベル3次元構造解析システムの開発を目的とした。

そこで、本装置では

- ・生体組織の3次元構造の3Dデータ化を自動で実行
- ・従来の切片作製および画像取得に3日費やしていたところを4時間に短縮

することを目指した。（図 1-2）



図 1-2 課題および開発装置の特徴

これらを実現するために重要な技術のレーザーアブレーションに関して、九州大学が熱損傷の極めて少ない生体組織をスライスする手法を発明した。

【特許の名称】 アブレーション装置及び3次元電子顕微鏡

【出願番号】 特願 2012-63526

【出願日】 2012年3月21日

【出願人】 国立大学法人九州大学

【概要】 生体試料をナノレベルで薄くスライスすることができ、スライス面を平滑にすることができるアブレーション装置

【抵触・利用】 該当なし

この特許技術は、エキシマレーザーを用いるものであり、エキシマレーザー照射による物質表面の光解離現象（アブレーション）を応用して表面スライスを実現している。さらに、表面層のスライスと共に焦点位置が変化する部分を自動ステージにより修正することで、表面スライス工程と SEM による撮像工程を連続かつ自動で行うものである。

特徴としては、パラフィン等で包埋された細胞組織が熱損傷を受けずにスライスされ、スライスによる組織の変態が発生することなく状態を保持できることが極めて優位である。

この特許については、株式会社 TCK が独占的通常実施権を取得し、この特許技術を基礎とした実証モデル機を製作したが、以下の課題が明らかになった。

- (1) アブレーション時に飛散する有機系分子の量が増加すると、真空度が低下し電子ビームの発生が阻害される。さらに、その飛散した分子が SEM の電子銃にも混入し、電子ビームの発生阻害を加速させてしまうことで、SEM の画像が取得できなくなる。
- (2) レーザー出力伝達の減衰が大きく、照射量の不安定化とそれに伴うアブレーション量の変化によってスライス厚みが均一にならず、本来の形状と異なった 3次元画像が表示されてしまう。また、試料が変わるたびに照射条件等を最適化する必要があり、その条件設定に半日以上の時間を費やしてしまう。

さらに、病理医へのヒアリングで、事業化のために以下の機能が必要であることがわかった（川下企業ニーズ）。

- (3) 病理医の診断業務負担を軽減するために、過去データと比較し、類似例を示すなどの病理判定を支援する機能が必要。

そこで、本装置の事業化のために以下の新技術開発に着手することとした。

- (1) アブレーション時に飛散する有機系分子を捕集する技術を開発し、電子銃への混入を防ぐ。
- (2) レーザー出力伝達の減衰を抑えたレーザー光路構成技術を開発し、アブレーション量の安定化を図る。また、試料別の照射量等の条件レシピ、およびそれら条件用パラメータの制御技術を開発し、ユーザーによる条件設定作業を簡素化する。
- (3) 3次元画像のデータベースとの連動技術を開発し、病理関係者の負担を軽減するための病理判定支援機能を追加する。

これまで開発した技術と本研究で新しく開発する技術を下表に示す。

課題		開発する新技術	対応するサブテーマ
アブレーション時の有機系分子の飛散による電子ビーム発生不良		飛散分子の捕集技術	【1】レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発
不安定な照射量に起因したアブレーション量の変化によるスライス厚みの不均一化	レーザー光路	レーザー光路の最適化	【2】レーザーアブレーションシステムの開発
試料により最適な照射条件が異なる	条件レシピ	制御ユニットの開発	
過去のデータベースとの比較などの病理判定を支援する機能が必要		データベースとの連動用アルゴリズム	【3】3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価

これらの課題を本研究開発事業で解決し、病理判定に対する支援を行うことで、病理関係者の負担軽減を可能とする生体組織のナノレベル3次元構造解析システムを開発すること、そして本装置の事業化をめざすことを本研究開発の目的とした。続いて、各サブテーマに関する開発目標を下記に示す。

サブテーマ【1】レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発

現行の TFE-SEM の性能を保持した上で、有機系分子の影響を受けない電子光学系を開発する。さらに画像の安定取得のためのステージ高精度化を実現する。加えて、開発期間中に明確になった有機系材料の画像明瞭化についても下表の通り目標を設定した。

項目	開発目標	根拠
【1-1】設計完了度	100%	—
【1-2】真空チャンバ真空度	10^{-4} Pa 台	1×10^{-3} Pa 以上になると電子銃室の真空度が悪化するため。
【1-2】電子銃室真空度	10^{-8} Pa 台	5×10^{-7} Pa 以上になると電子ビームが不安定になるため。
【1-2】観察面積 (mm ²)	4 以上	必要とされる処理面積は 4 mm ² であるため。
【1-2】位置決め精度	±0.2 μm 以下	10 万倍の画像合成許容値が 0.2 μm 以下であるため。
【1-2】画像コントラスト	平成 29 年度と比較して 3 倍	無機系材料観察時と同等とするため。

サブテーマ【2】レーザーアブレーションシステムの開発

本システムは全く新しい手法でこれまでの市場流通品と比較検討は困難である。そこで、課題解決に向けて、九州大学保有技術を応用して安定運用が可能かつ高精度な新規システムを開発する。開発目標を下記に示す。

項目	開発目標	根拠
【2-1】 設計完了度	100 %	—
【2-2】 光量伝達比	1/10 以上	透過率 80 %のレンズを 10 枚構成として試算
【2-2】 アブレーション量のばらつき	設定値の標準偏差±σ以上	一般的統計に基づいた設定

サブテーマ【3】3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価

3Dデータ化技術を確立し、過去の症例等のデータベースが必要となる点を除いたディープラーニングの画像判定機能を実現する。また、判定機能における学習機能の時間短縮アルゴリズムを確立する。開発目標を下記に示す。

項目	開発目標	根拠
画像3Dデータ化	2時間@200枚	病理医が当日中に確認ができる時間
3Dデータ比較判定	実3Dデータでのマッチング率90%以上	—

1-2 研究体制

(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

[事業管理機関:補助事業者]

公益財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

総括研究代表者(PL)
株式会社TCK
代表取締役 小坂 光二

副総括研究代表者(SL)
エルピクセル株式会社
代表取締役 島原 祐基

[研究実施機関:間接補助事業者]

株式会社TCK
サブテーマ【1】、【2】、【3】

エルピクセル株式会社
サブテーマ【3】

[アドバイザー]

九州大学
久留米大学
九州ヘルスケア産業推進協議会
株式会社日本レーザー

1-3 成果概要

1-3-1 レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発

レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発（サブテーマ【1】）

【1-1】レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の設計

【1-2】レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の製作・評価

3D データを構築する上でベースとなる二次元画像はナノレベルの分解能を有した高精細かつ明瞭な画質で取得できた。また、サブテーマ 2 のレーザーアブレーションシステムにより真空チャンバ内でアブレーションされた生体試料の有機系分子を捕獲する機能も組み込んだことで、真空チャンバおよび電子銃室の真空度の性能も達成できた。さらに組織全体を観察するための広域範囲の画像取得もステージの位置決め精度を達成したことで可能とした。これにより当初の計画通りのナノレベル 3 次元構造解析用に特化した電子顕微鏡が開発できた。

項目	開発目標	結果	達成度
【1-1】 設計完了度	100 %	100 %	100 %
【1-2】 真空チャンバ真空度	10 ⁻⁴ Pa 台	1.2×10 ⁻⁴ Pa	100 %
【1-2】 電子銃室真空度	10 ⁻⁸ Pa 台	8×10 ⁻⁸ Pa	100 %
【1-2】 観察面積(mm ²)	4 以上	25	100 %
【1-2】 位置決め精度	±0.2 um 以下	+0.18/-0.2um	100 %
【1-2】 画像コントラスト	平成29年度と比較して 3倍以上	3.3 倍	100 %

1-3-2 レーザーアブレーションシステムの開発

レーザーアブレーションシステムの開発（サブテーマ【2】）

【2-1】 レーザーアブレーションシステムの設計

【2-2】 レーザーアブレーションシステムの製作・評価

大気中に設置したエキシマレーザーを電子顕微鏡の真空チャンバ内へ高効率かつアブレーションに適した位置に到達／照射させるための構造とした。その上で安定的なアブレーションを実現するためのフィードバック制御を構築し、対象試料ごとに適した条件を設定する機能を具備した。しかし、アブレーション量のバラツキを評価する上でサンプル試料および計測方法の見直しが必要となったため、

正確な評価は継続的に実施することとなった。評価方法の再検討によりアブレーション量のばらつきについては目標未達となってしまったが、安定かつ最適な条件を設定し、信頼性のあるレシピ作りが可能な機能を有した。

項目	開発目標	結果	達成度
【2-1】 設計完了度	100 %	100 %	100 %
【2-2】 光量伝達比	1/10 以上	1/3.2	100 %
【2-2】 アブレーション量のばらつき	設定値の 標準偏差 $\pm\sigma$ 以上	測定方法の見直し	100 % 見込

1-3-3 3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価

3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価（サブテーマ【3】）

電子顕微鏡で取得した2次元画像を積み上げ、各画像同士のアライメントと高さ方向の補間処理を加え、3Dデータを生成した。画像同士のアライメントは高精度かつ高速で実行できるアルゴリズムを開発したことで当初の目標を上回る高速の3Dデータ化と高いマッチング性能を得ることができた。

項目	開発目標	結果	達成度
画像3Dデータ化	2時間@200枚	リアルタイム	100 %
3Dデータ比較判定	実3Dデータでの マッチング率 90 %以上	100%	100 %

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社TCK

研究開発グループ 大江 隆

E-mail : info@tck-i.jp

TEL : 092-710-4100 FAX : 092-710-4200

第2章 本論

本研究開発で実施したナノレベル3次元構造解析システム実現のために設定したサブテーマを示す。サブテーマ1では有機系分子を捕集する技術の開発のためレーザーアブレーション対応電子顕微鏡本体の開発を行った。サブテーマ2では、減衰を抑えたレーザー光路構成技術の開発および条件レシピを含めたレーザーアブレーションシステムの開発を行った。サブテーマ3では、3D データ化技術と病理判定支援機能の開発のため、3次元画像判定用エンジンの開発を行った。

2-1 レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の開発

開発する3次元構造解析装置にはナノレベルの観察分解能を有した電子顕微鏡に、アブレーションにより飛散した有機系分子の捕集機構、3Dデータ構築に不可欠な処理面積全域の観察を可能とする、高精度な位置決め機構を必要とした。

生体組織の3次元構造解析には、ナノレベルの分解能で観察することが必要不可欠であり、それが可能な電子顕微鏡をベースとしてアブレーションに対応させる方針とした。ただし、アブレーション時に飛散する有機系分子の量が増加すると真空度の低下につながることで、さらに、飛散分子が電子顕微鏡の電子銃に混入すること、の2つの要因により電子ビームの発生が阻害されるため、それらの対策を行った。

一方、必要とされる処理面積 4 mm^2 を達成するためには、同面積を観察することが必要になり、全域を観察可能とするようにステージを移動させ、一部分ごとに画像を取得、つなぎ合わせにより全域を表示させる手法をとる。その際、移動させるステージが精密でなければ、隣接する画像同士のつなぎ合わせ部にズレが生じ、正確な画像生成が困難になるため、高精度に位置決め制御可能なステージを開発した。

レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の設計（サブテーマ【1-1】）

■平成28年度

株式会社TCKはTFE-SEMをベースに、アブレーションにより飛散する分子が電子銃に混入することで起こる電子ビームの発生不良を防止するため、侵入経路を遮断するシールドと飛散分子を捕集する吸着トラップを真空チャンバに取り付ける方針で設計を行った。また、3Dデータを構築するために不可欠な高真空下で高精度に位置決め制御可能なステージを設計した。具体的には、高分解能を有するエンコーダの内蔵かつ正確

な動作を実現できる機構系を有し、高精度サーボ制御システムにより、繰り返し位置決め精度が $\pm 0.2 \text{ um}$ 以下かつ処理面積 4 mm^2 以上の動作を可能とするステージの設計を行った。

上記の機能を有した電子光学系、真空排気系、精密ステージと高真空を維持したまま試料交換が可能な試料交換室や装置架台となる除振ユニット、各機能部を制御するための制御ユニットを個別に設計した。そして、それらの各ユニットを統合し、シームレスなシステムの電子顕微鏡を構成した。以上により、電子顕微鏡に平成 29 年度に搭載予定としていたサブテーマ 2 のレーザーによるアブレーションが実現可能な機能も具備したレーザーアブレーション対応電子顕微鏡を設計した。

レーザーアブレーション対応電子顕微鏡の製作・評価（サブテーマ【1-2】）

■平成28年度

株式会社 TCK は、サブテーマ【1-1】のレーザーアブレーション対応電子顕微鏡の設計結果に基づき当該装置を製作した。当該装置は、電子光学系、真空チャンバ、精密ステージ、検出器、試料交換室、真空排気系、除振機構付架台、制御ユニットが主要ユニットとして構成され、それらの各ユニットを真空応用技術および精密調整技術を用いて、それぞれ組み立て調整を行った。そして、調整が完了した各ユニットをさらにシステム化とするための組立調整を行った。さらに、一つのシステムとして調整を行った後に真空チャンバおよび電子銃室の真空度評価を行い、いずれも目標を達成することができた。これにより次年度以降に開始するレーザーアブレーションとのシステム化の準備が予定どおり整った。

■平成29年度

株式会社 TCK は、平成28年度までに製作および評価した装置の性能向上のために新しい機能を追加した。サブテーマ 2 の開発と合わせて、レーザーアブレーションの対策として、飛散した分子をより素早く吸着するための機構や、飛散した分子を素早く回収するための排気系の構成および構造を見直した。そして、同時に開発するレーザーアブレーションシステムをドッキングした状態で評価を繰り返した。その結果、電子銃室に必要な安定的な真空度 $7 \times 10^{-9} \text{ Pa}$ 、真空チャンバも $8.1 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ といずれも目標を達成することができた。これによりアブレーションにも対応しつつ、電子顕微鏡に

必要となる基本性能を満足できた。その結果を図 2-1 に示す。

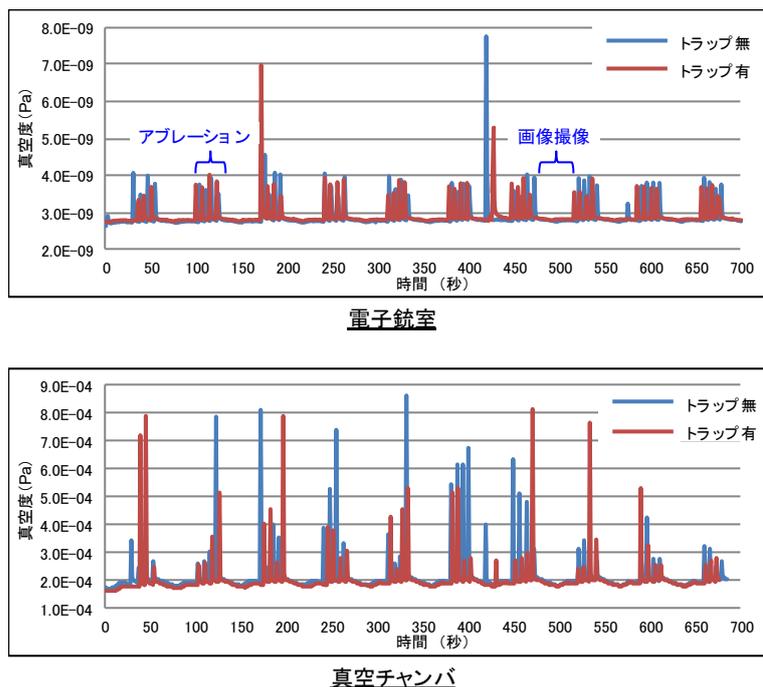


図 2-1 真空度

また、電子顕微鏡の原理性から高分解能を有したまま広域範囲を一つの画像で取得することは不可能である。そこで、広域範囲の画像取得するためには高分解能かつ狭域の画像を多くつなぎ合わせることで広域の画像としなくてはならない。そのため、画像のつなぎ合わせには隣接する画像との位置合わせが重要となり、その動きを司るステージは試料を正確に搬送しなくてはならない。そこで、調整完了したステージの可動軸 X 軸および Y 軸の位置決め精度の計測を行った。X、Y 軸ともに目標 $\pm 0.2\mu\text{m}$ 以下に対して、 $+0.18/-0.2\mu\text{m}$ 、 $+0.01/-0.2\mu\text{m}$ と目標を達成できた。その結果を図 2-2 に示す。

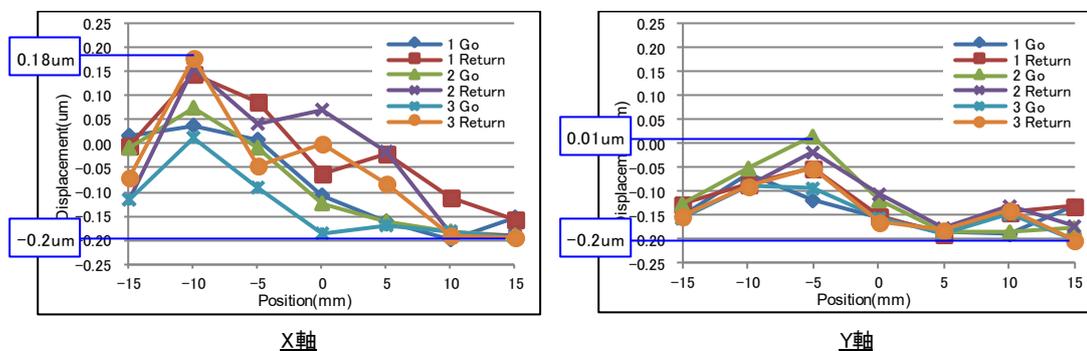


図 2-2 位置決め精度

加えて、サブテーマ 2 のレーザーアブレーションを制御するための UI を本装置ソフトウェアに組み込み、一つのシステムとしてシームレス化を図った。この機能により電子顕微鏡の操作の一環としてレーザーアブレーションを行えるソフトウェアとなり、使用勝手の良い構成となった。本ソフトウェアを以下の図 2-3 に示す。

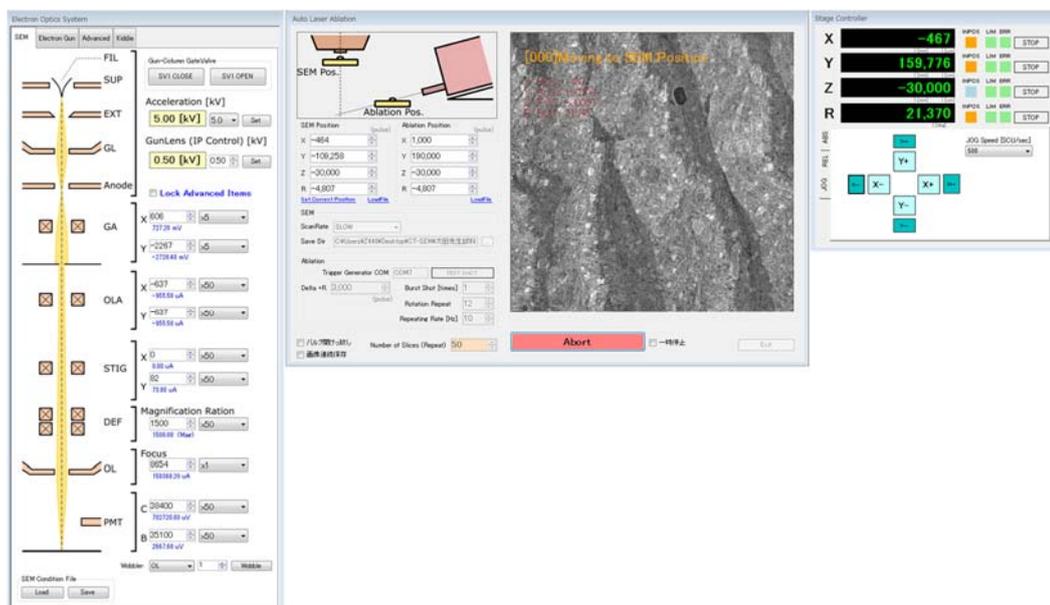


図 2-3 装置ソフトウェア

そして、その過程において電子顕微鏡で取得した画像の評価を実施したところ、無機系試料では従来通りの画質が確認できたが、有機系材料のマウスの細胞組織を観察したところ画像のコントラストが付きづらく不明瞭であった。そのため、画像取得には多くの時間を費さなければならず、本装置の目指す時間短縮とは異なってしまふ。そこで、この事象を新たな課題として研究メンバー間で検討を行った結果、画像の取得に不可欠な画像生成ユニット自体の改良が必要と判断し、次年度の開発目標に新たに設定した。

■平成 30 年度

株式会社 TCK は、平成 29 年度までに製作および評価したレーザーアブレーション対応電子顕微鏡を改良した。改良点としては、平成 29 年度に明らかになった電子顕微鏡画像の不明瞭な点を解決するための画像生成ユニットを改良し、コントラスト比の高い画像が取得可能な機能を具備した。

具体的には試料から得られる情報を取得する検出デバイスの変更や検出ユニット自体

の構造の機構系および電気回路の見直しを行い、当初の計画どおりの時間で画像取得を行った。その結果、目標としていた前年比3倍以上の3.3倍を達成した。比較画像を図2-4に、比較結果を図2-5に示す。

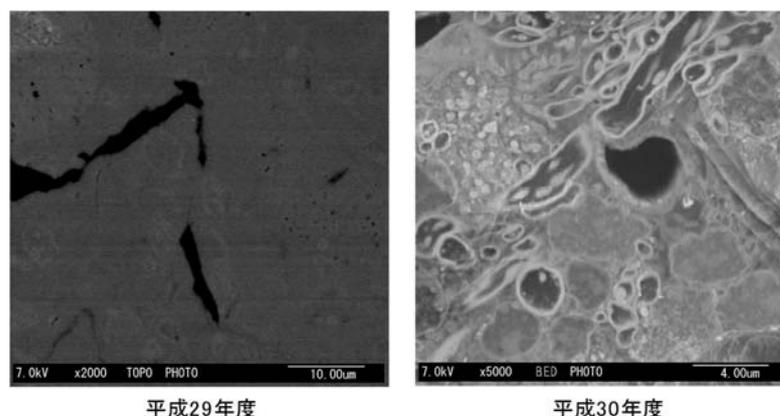


図2-4 比較画像

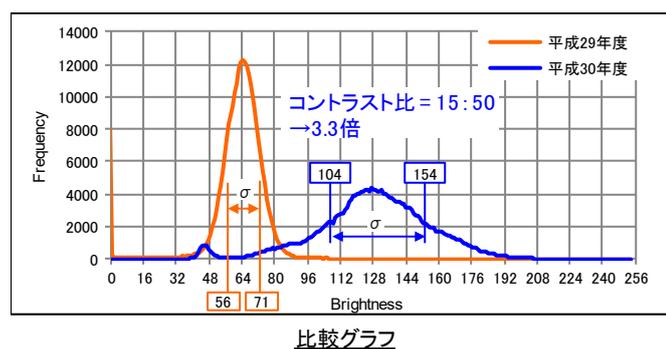


図2-5 コントラスト比較

2-2 レーザーアブレーションシステムの開発

レーザーアブレーションシステムはエキシマレーザーを光源として真空チャンバ内の試料まで光を到達させ、そのエネルギーで試料をスライスするものである。アブレーション時のレーザーの照射量にバラつきが生じると、スライス層の厚さが変化し、結果として不均一な間隔の画像が撮影される。この画像を基に3次元化すると、実態と異なる3Dデータが得られることになる。

これを防ぐためには試料をスライスする際の厚みを均一に保つ必要があり、そのためにアブレーション時のレーザー照射量およびパルス幅を厳格に制御する技術を確立した。加えて、電子顕微鏡による撮像工程とアブレーション工程を同調させることで、正確な

3Dデータ化に必要な画像を取得できるレーザーアブレーションシステムの開発を行った。

まず、細胞組織の表面層でアブレーションを起こすためには、エキシマレーザーの試料面への照射が条件となる。そのエキシマレーザー光源は混合ガスによる励起方法が採用されているため、大気中の設置が必須であった。そこで、エキシマレーザーの真空チャンバ内の試料面への導入は、大気中の光源から光学レンズ等によって真空チャンバ内へ所定の位置に導き、試料面に照射する方針とした。

また、エキシマレーザーは減衰しやすい特性があるため、減衰しにくいレンズを用いることが必要不可欠であったが、当該レンズは、レーザー特性に最適化したカスタム品を用いると、1枚あたり数十万円と非常に高額であった。そこで、機器の低コスト化のために、1枚あたり10%～30%程度の減衰を招く一般的なレンズを用いる方針とした。この減衰によるデメリットについては、レーザー光路を最適化することにより、減衰量を最低限に抑制することで解決を図った。

加えて、レーザーの照射量やパルス幅を指定した条件で動作可能とするパルス制御回路と照射量に揺らぎが発生した場合に指定値に再調整するフィードバック回路により、安定してアブレーションを行う制御ユニットを開発した。さらに、各試料の最適なアブレーション量を条件レシピとし、試料に応じた条件提示が可能となる機能を盛り込んだ。

レーザーアブレーションシステムの設計（サブテーマ【2-1】）

■平成29年度

株式会社 TCK は、大気中に設置するエキシマレーザー光源を光学レンズ等によって真空チャンバ内へ所定の試料位置に導くための光路設計を行った。そして、減衰を最小限に抑えた光学および機構レイアウトを行い、隣接する電子顕微鏡へ悪影響を及ぼさない構造設計を実施した。

また、3次元画像合成時の正確性を保つため、レーザー出力とアブレーション量との相関が制御可能な回路を設計した。加えて、開発するレーザーアブレーション対応電子顕微鏡とレーザーアブレーションシステムをシームレスに接続するための電気回路、およびコマンド授受が可能な制御ユニットの開発も実施した。

レーザーアブレーションシステムの製作・評価（サブテーマ【2-2】）

■平成 29 年度

株式会社 TCK は、サブテーマ【2-1】で設計したレーザーアブレーションシステムの製作および評価を行った。

まず、レーザーアブレーションシステムの光学レンズ群の組立調整を行い、レーザーアブレーションシステムの機構系ユニットとして完成させた。そして、当該ユニットをレーザーアブレーション対応電子顕微鏡とドッキングさせて、レーザー光の光量伝達比の計測を行った。設計当初の試算では、1/10 以上と予測していたが、減衰量を抑制するためにレンズレイアウトの大幅な変更を行い、目標を大きく上回る 1/3.2 を達成した。計測ポイントおよび計測値を図 2-6 に示す。

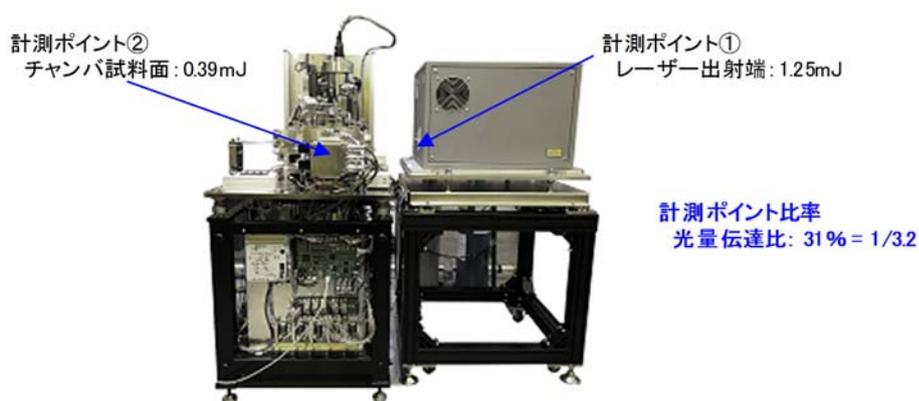


図 2-6 光量伝達比計測

また、レーザー照射によるアブレーション量の調整機能やレーザーアブレーション対応電子顕微鏡システムの刻々と変化する状態に合わせて、アブレーション量を調整可能な制御ユニットとそれらの専用ソフトウェアの開発も行った。

■平成 30 年度

株式会社 TCK は、平成 29 年度から継続して評価を実施した。はじめに、アブレーションシステムの基本原理を構築し、生体試料へのアブレーションの可否およびその変化を観察した。その際のアブレーション対象をマウスの生体組織とし、そのアブレーション毎に取得した電子顕微鏡画像を図 2-7 に示す。

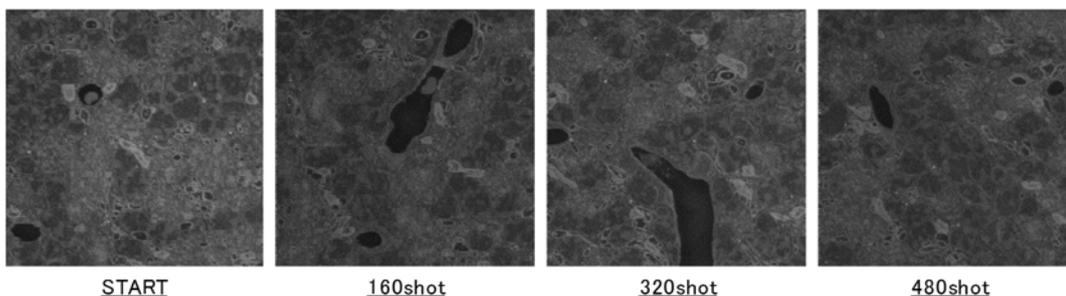


図 2-7 アブレーション画像

また、アブレーション時に設定した均一エネルギーで評価サンプルにおけるアブレーション量のバラツキを計測した。あらかじめ寸法が明確になっているサンプルをアブレーション標本として、レーザー1パルス毎の照射によるアブレーション量を計測した。その結果を、以下の図 2-8 に示す。

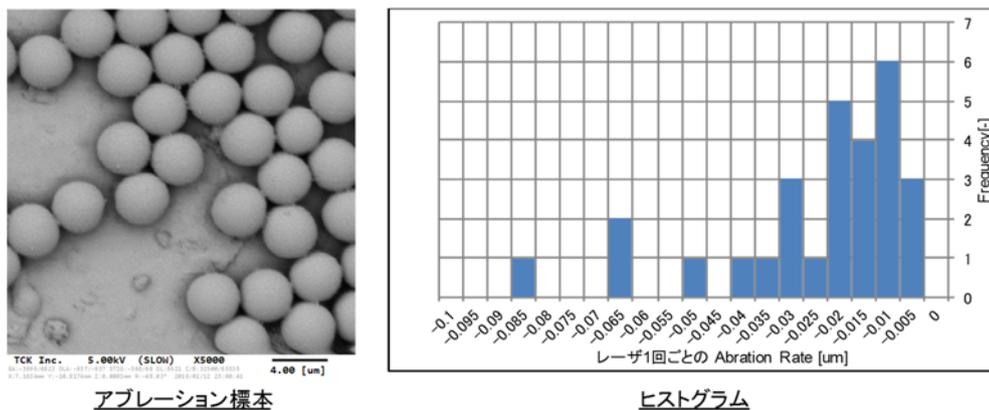


図 2-8 アブレーションバラツキ計測

目標としては、設定したエキシマレーザーのエネルギーで各パルスのアブレーション量のバラツキが $\pm\sigma$ 以上に収まることとしていたが、計測結果は目標達成とはならなかった。これは、アブレーション標本となるサンプルが図 2-8 左図のような塊で存在しているとアブレーション時に周辺のサンプルと干渉してしまい、アブレーション量が均一にならないことが原因と考えられる。この課題を解決するためには新たな標本および評価方法が重要となるため、継続的に評価方法を見出しているところである。

一方で、生体試料で相対的な評価を繰り返し実施した結果では、安定的な結果が得られたことからサブテーマ【1】および【3】との連動評価へ移行した。

2-3 3Dデータ化技術及び3次元画像判定用エンジンの開発・評価

本開発では、電子顕微鏡およびレーザーアブレーションシステムで取得した2次元画像を3Dデータ化して表示することが特徴の一つである。3Dデータ化する際に、初めに取得した画像と次に取得した画像の間には若干の空間が生じるため、完全な3Dデータとするには、その前後の画像から特徴を抽出し、補間処理を行わなければならない。したがって、2次元の画像データに補間処理を加え3次元のボクセルデータへ再構築する、3Dデータ化技術を開発した。

次に、生成した3Dデータをデータベースにある過去の症例などの3Dデータと比較し、特徴が一致するものなどをデータ抽出して病理診断の補助情報を生成する3次元画像判定用エンジンを開発した。

■平成28年度

エルピクセル株式会社は、2次元画像を3Dデータとするために、画像をスタックする際の画像のアライメントを調整し、画像間の補間データを生成するためのアルゴリズム開発に着手した。なお、開発する本装置による実画像の取得は平成29年度以降のため、まずは同等のサンプル画像をアドバイザーより入手し評価を行った。株式会社TCKはこれまで画像処理を応用した装置開発を行ってきた実績があったことで、その画像処理技術をベースとし、新しく3Dデータ生成技術の開発に取り組み、サンプル画像での3Dデータ生成が可能なソフトウェアを開発した。

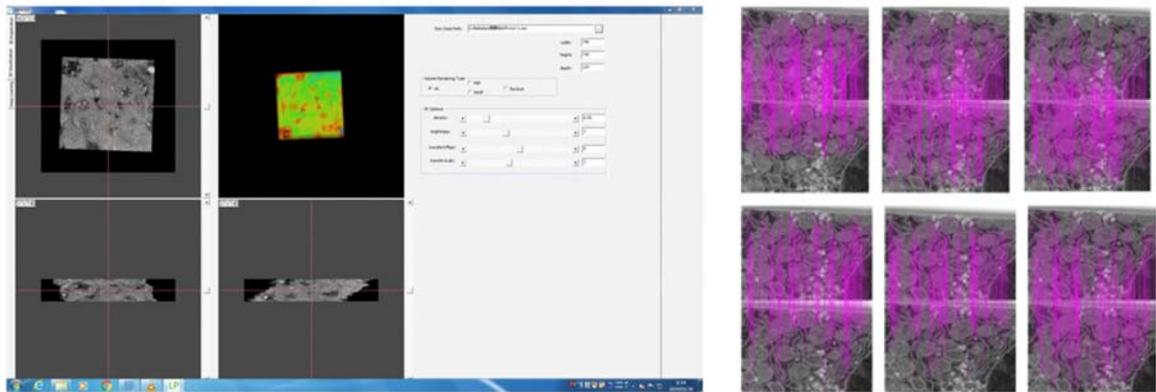
3Dデータ化のベースとなる2次元画像の特徴点抽出およびアライメントのアルゴリズム開発は、並行してエルピクセル社が実施した。また、エルピクセル株式会社は保有する画像解析技術を用いて、3Dデータから任意の位置での断面画像の生成および当該画像から特徴を抽出する機能の開発に着手するために、入手した画像を用いて画像のアライメントおよび3D化を行った。アライメントには、機械学習による画像検索・認識・分類タスクにおいて、よく用いられている方式で、画像内から特徴点の検出と特徴量の記述を、異なる画像間でマッチングをとることのできるSIFT (Scale-Invariant Feature Transform) 技術を用いた。その技術の使用時および未使用時では3Dデータ化した際に明確な差が現れたため、3Dデータ構築が予定通りに達成できた。

■平成 29 年度

平成 28 年度に開発した 3D データ化技術について、実際に取得した実画像を用いて検証し、3D データ化技術を完成した。2次元画像から 3D データ化を行い、3D データの補間精度の検証および高精度化を実施した。その精度向上に向けて、エルピクセル社が 3D データ生成技術に関するアルゴリズムの高度化に取り組み、成果を得た。また、エルピクセル社では以下を実施した。平成 28 年度に用いた画像アライメント技術では、高い精度を得るために非常に大きな情報量の計算を必要とした。加えて、高解像度画像を扱う際にも同様に計算量が増加した。そのため、これらに対処するためには、処理速度の高いハードウェアを用いる対応や異なるアルゴリズムなどでの処理の検討をして方針を決定した。さらに、サンプル 3D データを用いて局所的な特徴点抽出およびデータ解析を行い、比較検証を行った。

■平成 30 年度

平成 30 年度の目標である処理時間短縮のため、平成 29 年度に開発した 3D データ化技術の高速化を実施した。高負荷処理にも対応可能な NVIDIA Quadro P6000 を搭載した GPU 環境の下、ログイン、画像読み込み、立体構成までをリアルタイムに近い速度でマッチング率 100% を実現し 3D 再構築するソフトウェアを実装した（図 2-9 左）。また、読み込んだ画像のサイズを自動的に入力する仕様に変更することで手入力の手間を削減しソフトウェアの使用感向上も実現した。平成 30 年度はサンプル数を増加させ都度チューニングを施し、様々な形態で利用可能なアルゴリズムへと改良した。これらの開発により 3D データ比較判定の精度を 100% まで高めることができた（図 2-9 右）。



ソフトウェアの画面

高マッチング結果

図 2-9 ソフトウェア画面およびマッチング率100%の様子

立体構築アルゴリズムの開発に関しては、Z軸方向の滑らかな3D化を追加課題として認識し、入力された画像の解像度を高めて出力するいわゆる超解像技術（図2-10）を用いることで解決に至った。具体的には chainer の convolutionND 関数の応用、さらには平均ボリューム生成・ボケの除去等も実装した。

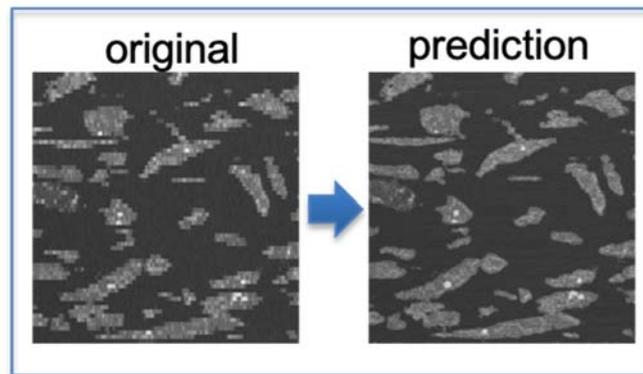


図 2-10 超解像技術を用いた解像度向上の様子

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

3年間の事業では、レーザーアブレーション対応電子顕微鏡、レーザーアブレーションシステム、3D データ化技術及び3次元画像判定用エンジンの3つの大きなテーマが概ね目標を達成できた。また、顧客より預かったサンプルでのデモンストレーションにおいても一定の評価を得ることができたため、装置自体の完成度は良好である。加えて、それぞれのテーマ自体に含まれる要素技術などは他の製品等への展開も十分に考えられるため、今後、他製品への応用展開を図る。一方で、レーザーアブレーションシステムに関する一部の評価の再検討が必要ではあるため、継続的に評価方法の見直しおよび結果の評価を行っていく。しかし、当該問題自体は、事業化する上では大きな問題とはならないため、評価を継続しつつ今後は事業化に向けて加速していく計画である。

3-2 研究開発後の課題

研究開発期間中に実施したデモンストレーションなどから最も重要な課題として、サンプルの種類および量を多く実施する必要があると考えられる。例えば、貴重なサンプルであった場合、アブレーションのパラメータ設定などの条件出しを繰り返し行うことが困難であり、評価時のパラメータ設定に余裕が無いため、顧客のサンプルを駄目にすることも考えられる。それゆえ、事前にある程度のパラメータが絞り込めるようなデータベースの拡充が課題である。

また、これまでにリファレンスとなる教師データがほとんど無いことで、その信頼性を明示することが困難である。そのため、一般的に形状が既知なものを本装置で実際に構造解析を行い比較検証することや、前述同様に多くの量を実施し、データの確度を向上させることで信頼性を得ていくことも課題である。

3-3 事業化展開

提案時点の計画より、事業化においては、はじめに顧客より預かったサンプルの3Dデータを販売する3Dデータサービスと次に装置自体を販売する、二つの事業展開を予定していた。本研究開発期間中の市場調査でもデータサービスの開始を要求される声が非常に多かったため、当初の計画通りで事業化推進を図る。また、市場投入するための

準備として新たに開発したいいくつかの技術の知財保護を進めているところである。そして、それらと並行してデータサービスの事業化を2020年の開始に向けて急ぐ。そのために、販路拡大を目的とした新たな事業所の増設と従業員の新規雇用を促進して、事業開始5年後にはデータサービスおよび装置販売で合計10.8億円の売上げを目指す。