

令和6年度
博士(工学)

細菌の自家蛍光の分光計測と機械学習を利用した
迅速な細菌検査手法の開発と社会実装に向けた事業実践

Development of Rapid Bacterial Testing Methods
Utilizing Autofluorescence Spectrometry and Machine Learning,
and Business Practices toward Social Implementation



光産業創成大学院大学
光産業創成研究科
光情報システム分野

御任 大輔

要旨

細菌の自家蛍光の分光計測と機械学習を利用した 迅速な細菌検査手法の開発と社会実装に向けた事業実践

御任 大輔

細菌感染症は、医療現場において依然として解決が求められる重要な課題である。その迅速かつ正確な診断、さらに適切な抗菌薬の選択は、患者の予後を改善するだけでなく、公衆衛生全体においても極めて重要な意義を持つ。また抗菌薬耐性菌の増加は世界規模で深刻な脅威となっており、これらの耐性菌の拡散を防ぐためには、迅速かつ精度の高い診断に基づいた抗菌薬の適切な選択が欠かせない。しかしながら、現在広く用いられている従来型の細菌同定手法である古典的な培養同定法は、最終的な同定結果を得るまでに長時間を要するという根本的な制約を抱えている。この時間的な遅れは、感染症診療において適切な抗菌薬を迅速に選択することを困難にする要因となるだけでなく、耐性菌が発生する重要な一因ともなり得る。

本研究では、この課題を解決するために、細菌が持つ自家蛍光特性に着目し、光学測定と機械学習を組み合わせた新たな細菌種同定手法を提案する。自家蛍光は細菌の代謝産物や細胞構造由来の蛍光であり、非破壊的かつ迅速に測定可能である。この特性を活用すれば、サンプルの前処理を最小限に抑えた簡便な計測で、菌種の同定が実現できる。さらに、機械学習アルゴリズムを用いて自家蛍光スペクトルデータを解析することで、微細なスペクトルの差異を捉え、高精度な細菌種の識別が期待できる。またリアルタイムな計測によって経時的な細菌の動態変化を捉えることができる。本研究の目的は、自家蛍光スペクトル解析と機械学習を組み合わせた新しい細菌種同定手法の確立と、その技術を実装した低コスト・高性能な蛍光計測装置の開発である。これにより、感染症診断の迅速化と精度向上を達成し、医療現場での適切な治療選択に貢献することを目指した。

学術研究としては、まず、蛍光分光光度計を用いて、臨床的に重要だと考えられる10菌種14菌株について細菌の自家蛍光スペクトルデータを計測した。得られたデータから、各菌種間で特異的なスペクトルパターンが存在することを明らかにし、自家蛍光を用いた菌種同定の可能性を示した。次に、取得した自家蛍光スペクトルデータに対して、機械学習アルゴリズムを適用し、細菌種の分類モデルを構築した。また、ハードウェアの制約を前提としたデータ処理手法やアルゴリズムの最適化を行い、効率的な測定方法を明らかにした。

事業実践としては、学術研究で得られた解析結果を基に、LED光源を用いた菌種同定に最適化した装置を試作することで、現場での使用を念頭に置いた性能や、量産を前提とした構成部品の選定について検討した。市場分析を通じて細菌迅速検査市場の動向や競合製品の状況を把握し、本手法の競争優位性を明確化した。迅速性、高精度、低コスト、操作の簡便さといった強みを活かし、ターゲット市場を設定した。ビジネスプランを策定し、収益予測、資金調達戦略、マーケティング戦略を具体化した。

本研究の意義として、光学測定と機械学習による解析を組み合わせ、ハードウェアの制約を前提とした新しい分析手法を研究した点が挙げられる。自家蛍光スペクトルという非侵襲的かつ迅速に取得可能なデータを活用し、機械学習アルゴリズムで解析することで、従来の方法では困難であった高精度な菌種同定を実現した。また、医師が主体的に工学的な開発に携わることで、臨床現場のニーズを直接反映した実用的なデバイスの創出を実現した。これは、医療従事者と工学技術者の連携を深め、医療機器開発の新たなモデルケースとなり得る。最終的には、技術的課題の克服により公衆衛生の向上や医療技術の革新に大きく寄与するとともに、本研究を基盤として感染症診断の迅速化と精度向上に寄与する製品を実用化し、医療現場や社会に貢献することを目指す。

Abstract

Development of Rapid Bacterial Testing Methods Utilizing Autofluorescence Spectrometry and Machine Learning, and Business Practices toward Social Implementation

Daisuke Mito

Bacterial infections remain a critical issue in clinical settings that must be effectively resolved. Rapid and accurate diagnosis, along with the appropriate selection of antibiotics, would improve patient prognosis, which holds significant importance for public health in general. Moreover, the increase in antibiotic-resistant bacteria has become a serious global threat. To prevent the spread of these resistant strains, appropriate selection of antibiotics based on swift and highly accurate diagnostics is crucial. However, conventional culture identification methods for bacterial identification are fundamentally limited by the need for extended periods to obtain the final identification results. The long time requirement not only hinders prompt antibiotics selection but can also become a critical driver of the emergence of resistant bacteria.

In this study, we addressed this challenge by examining the autofluorescence properties of bacteria and proposed a novel bacterial species identification method that combines optical measurement with machine learning. Autofluorescence arises from bacterial metabolites and cellular structures and can be measured rapidly and nondestructively. Using this characteristic, bacterial species can be identified through simple measurements with minimal sample preprocessing. Furthermore, by analyzing the autofluorescence spectral data using machine learning algorithms, this identification method could capture subtle spectral differences and achieve highly accurate bacterial species discrimination. Real-time measurements also enable the observation of temporal changes in bacterial dynamics. Therefore, this study aimed to establish a new bacterial species identification method by integrating autofluorescence spectral analysis with machine learning while developing a low-cost, high-performance fluorescence measurement device implementing our proposed technology. Ultimately, we sought to achieve rapid and highly accurate infectious disease diagnosis and contribute to appropriate treatment selection in clinical practice.

From an academic research perspective, we first obtained the autofluorescence spectral data of multiple clinically significant bacterial species using a fluorescence spectrophotometer. In this study, we obtained autofluorescence spectral data from 14 strains across 10 clinically significant bacterial species, thus demonstrating the potential of autofluorescence in bacterial identification. Using the data obtained, we elucidated the existence of specific spectral patterns among different bacterial species, demonstrating the potential utility of autofluorescence in bacterial identification. Next, we applied machine learning algorithms to the acquired spectral data and constructed bacterial species classification models. Furthermore, we optimized the data processing methods and algorithms under hardware constraints to explore efficient analytical techniques.

From a business development perspective, we prototyped a device optimized for bacterial species identification using LED light sources based on our research results. We considered the

performance suitable for on-site use and selected components conducive to mass production. We conducted market analysis to understand the trends in the rapid bacterial identification market and the status of competing products, thereby establishing the competitive advantages of our proposed method. We then defined the target markets by leveraging strengths such as rapidity, high accuracy, low cost, and ease of operation. Finally, we formulated a business plan detailing revenue projections, funding strategies, and marketing approaches. Furthermore, the active involvement of physicians in engineering development enabled the creation of practical devices that directly reflect clinical needs. This collaborative approach between medical professionals and engineers represents a new model for medical device development. Ultimately, overcoming technical challenges through this research contributes to public health improvements and innovations in medical technology. By building upon this foundation, we aim to accelerate and enhance the accuracy of infectious disease diagnostics, bringing tangible benefits to clinical practice and society as a whole.

目次

1. 序論

1.1. 研究の背景	1
1.1.1. 感染症の定義と分類、および細菌感染症	1
1.1.2. 細菌の生物学的特性と人間社会への影響	3
1.1.3. 敗血症の病態生理	3
1.1.4. 臨床現場における細菌感染症診療の現状	3
1.2. 研究の動機	4
1.2.1. 現場における問題点	4
1.2.2. 医師主導の医工連携研究の意義	5
1.3. 研究の目的と方法	6
1.3.1. 自家蛍光分析と機械学習を用いた細菌同定システムの研究開発	6
1.3.2. 実用化に向けた開発戦略と事業化計画	6
1.4. 論文の構成	7

2. 細菌の自家蛍光の計測

2.1. はじめに	11
2.1.1. 有機物の測定手法の概要と分光計測の位置づけ	11
2.1.2. 蛍光分光法の原理と特徴	12
2.1.3. 自家蛍光の原理と特徴、菌種同定における利用	12
2.1.4. 蛍光分光光度計の構造と特徴	13
2.2. 細菌サンプルの準備	15
2.2.1. 菌株の選定と培養	15
2.2.2. サンプルの調製	16
2.2.3. 菌種毎の検量線の作成	16
2.3. 蛍光分光光度計によるサンプルの計測	19
2.3.1. 実験セットアップ	19
2.3.2. データ収集、前処理	21
2.3.3. 細菌自家蛍光の全体的な傾向	22
2.4. 自家蛍光の菌種間の差異	24
2.4.1. 菌株ごとのEEMの比較	24
2.4.2. EEMから抽出した個別の励起波長の蛍光スペクトルによる比較	26
2.4.3. 統計学的な解析を用いた比較	32
2.5. まとめ	34

3. 機械学習による自家蛍光データを用いた菌種同定

3.1. はじめに	36
3.1.1. 機械学習について	36
3.1.2. 細菌の自家蛍光データに対する機械学習の適用について	38
3.1.3. ベイズ最適化について	39

3.2. 菌自家蛍光スペクトルデータに対する機械学習の適用	41
3.2.1. データの前処理	41
3.2.2. 機械学習モデルの選択と構築	45
3.2.3. モデルのトレーニングと評価方法	47
3.2.4. チューニングによる診断精度の変化	48
3.3. 励起波長の診断精度への影響	55
3.3.1. 単波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について	55
3.3.2. 2波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について	59
3.3.3. 3波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について	61
3.3.4. 4波長以上のスペクトルを用いた場合の診断精度について	64
3.4. 波長幅の診断精度への影響	68
3.4.1. 励起光バンド幅の変化によるスペクトル形状の変化と、積算のシミュレーション	68
3.4.2. 合成蛍光スペクトルの波長領域およびその個数と診断精度について	71
3.4.3. 合成励起スペクトルの波長領域およびその個数と診断精度について	75
3.5. まとめ	78

4. 菌種の同定に最適化した計測装置の開発

4.1. 光源の選定と最適化	81
4.1.1. 試作用LEDの選定と、発光特性を反映した合成蛍光スペクトルのシミュレーション	81
4.1.2. ベイズ最適化を使った計測装置用LEDの最適化	84
4.2. 光源と光学系の開発	87
4.2.1. 単一LEDを用いた試作	87
4.2.2. 単一LEDを用いた試作による測定結果	89
4.2.3. 複数LEDを用いた試作	92
4.3. 検出系の開発	94
4.3.1. 分光計のセンサー温度による暗電流ノイズ	94
4.3.2. 分光計の設計と試作	95
4.3.3. 試作した分光計の性能評価	97
4.3.4. 微弱光計測のための分光計の設計と試作	102
4.3.5. 試作した分光計による計測	104
4.3.6. センサーの設計	110
4.4. まとめ	115

5. 事業実践と起業に向けた環境構築

5.1. 市場分析	116
5.1.1. 細菌迅速検査市場の概要	116
5.1.2. 市場動向と成長要因	118
5.1.3. 競合企業	118
5.1.4. 市場ニーズ、顧客要求、市場参入の機会とそれに伴うリスク	119
5.2. 競合製品の現状と新アプローチによる優位性の検討	120
5.2.1. 市場における競合製品の概要、および臨床現場における評価	120
5.2.2. 新しいアプローチによる競争優位性	121

5.3. ビジネスプランの戦略的構築と実行計画	122
5.3.1. ビジネスモデルの構築.....	122
5.3.2. 収益予測	122
5.3.3. マイルストーンの設定	123
5.3.4 パートナリーシップの構築と成功指標の設定.....	124
5.4. 医療機器市場参入のための法的要件とリスク管理	126
5.4.1. 医療機器に関する各国の法規制の概要	126
5.4.2. 本邦における医療機器承認プロセスと認証プロセス	127
5.4.3. 新規参入の課題とリスク管理	128
5.4.4. 国際規格と標準への適合	129
5.5. 研究開発費の確保と持続的資金戦略	130
5.5.1. 研究開発費の必要性と目的	130
5.5.2. 資金調達の戦略	130
5.5.3. 助成金・補助金と他人資本・自己資本との違い	132
5.5.4 学術領域とビジネス領域の求められるコミュニケーションの違い	132
5.6. 新規事業創出に向けた支援リソースの活用	134
5.6.1. 起業家を支援する様々な制度	134
5.6.2. 経済産業省の「始動」プログラム	135
5.6.3. JETROのドイツ出展&ビジネスアテンド支援事業	136
5.6.4. MEDISOの医療系ベンチャー・トータルサポート事業	137
5.6.5. 都道府県の特定創業支援	137
5.7. まとめ	138
6. 結論	
6.1. 研究の総括	142
6.2. 結論	142
6.3. 研究の限界と今後の展望	142
7. 謝辞	
8. 補遺	
8.1. データセット	145
8.2. コード	145
8.3. 使用部品一覧	145
8.3.1. LED光源の検討時のシミュレーションに使用したLED（4.1.参照）	145
8.3.2. 単一LEDによる試作に使用した部品（4.2.1.参照）	145
8.3.3. 複数LEDによる試作に使用した部品（4.2.3.参照）	146
8.3.4. 分光計の試作、評価に使用した部品（4.3.2.参照）	146
8.3.5. 微弱光用の分光計の試作に使用した部品（4.3.4.参照）	146
8.3.6. センサーの試作、評価に使用した部品（4.3.6.参照）	147
8.4. 事業実践記録	147

1. 序論

本章では、本研究の背景となる感染症およびその治療についての現状と課題、そして本研究の目的と方法、および本論文の構成について論じる。

1.1. 研究の背景

1.1.1. 感染症の定義と分類、および細菌感染症

細菌、真菌、ウイルス、寄生虫などの病原微生物が生体内に侵入し、増殖することで発症する疾患を感染症と呼ぶ¹。これらの微生物は空気、食物、水、接触、動物媒介など様々な経路を通じて、人から人へ、または家畜などの動物たちの間で、あるいはこれら動物と人との間で伝播する。感染症は古くから人類の健康に様々な影響を及ぼしており、歴史上、多くの局地的な流行やパンデミックを引き起こしてきた²。

感染症の種類は侵入する病原体の種類と侵入され症状の出現する部位の組み合わせによって多岐にわたり、それによって生じる症状や重症度も様々である^{3,4}（**図1-1**）。大まかに分類された病原体ごとの代表的な一般的な例としては、コレラや結核、膀胱炎などの細菌感染症、インフルエンザや麻疹などのウイルス感染症、爪白癬（水虫）などの真菌感染症、マラリアや日本住血吸虫症などの寄生虫感染症が挙げられる。特に細菌感染症は、有史以前から人類にとって深刻な疾患として認識されており、その克服は長年医学上の重要な課題であった²。これに対し、Flemingによるpenicillinの発見⁵によって薬物的な治療が可能になってからは、様々な抗菌薬が開発されてきた⁶。さらに各国の公衆衛生の向上やワクチンの普及によって、結核などのようにかつては致命的だった感染症の発症率が時間をかけて改善された例もある⁷。しかし同時に、抗菌薬の過剰使用による耐性菌の出現や、グローバル化や気候変動による新興感染症の拡大など、時代に合わせた新たな課題も次々に生じている^{8, 9, 10, 11}。

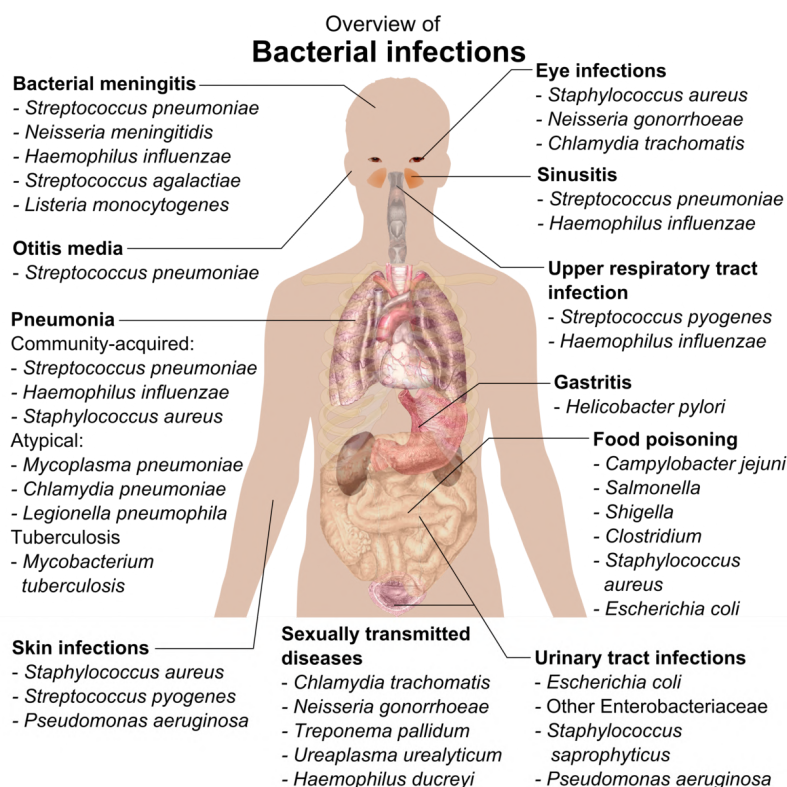


図1-1 細菌と感染症（文献4より引用）

ヒトにおける細菌感染症と、感染部位ごとの検出頻度の高い菌種の一覧。

疾患名が同じでも原因菌が異なる場合があること、また原因菌が同じでも感染部位によって疾患（あるいは症状）は異なる。

感染症の発症機序は、まず病原体が体内に侵入し、生体を持つ免疫システムによる防御を突破して局所的に増殖することから始まる。細胞や組織に付着・侵入した病原体は、増殖する際に直接的な損傷を与えるか、増殖時に毒素を産生して生体に間接的に障害を引き起こす¹²。あるいはまた、病原体の増殖によって宿主の免疫反応を過剰に応答させることで、炎症や組織破壊を招いた結果、疾患の症状として現れる場合も多い¹³。発症の程度や症状は、病原体の種類、感染部位、感染量、宿主の免疫状態などにより大きく異なり、また地域や社会環境、季節性などの要因によっても影響を受ける¹⁴。

感染症による疫学に関して、世界保健機関の報告によれば、気道感染症は2019年に全世界で約260万人の死亡を引き起こし、世界における死因の第4位となっている¹⁵（図1-2）。また、細菌感染をはじめとする病原体が血流を介して全身性の炎症反応を引き起こし臓器障害を伴う状態を敗血症と呼ぶが、2017年には全世界で約4,900万人が敗血症を発症し、そのうち約1,100万人が死亡している¹⁶。米国疾病予防管理センターの報告によれば、米国では毎年約280万人が耐性菌による感染症に罹患し、約35,000人が死亡している¹⁷。耐性菌の拡大は抗菌薬の不適切な使用や過剰使用が一因とされており、世界的な公衆衛生上の脅威と認識されているが、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌や多剤耐性緑膿菌などの耐性菌は、抗菌薬治療の選択肢を狭め、臨床現場における感染症管理を複雑化させる一つの要因となっている。

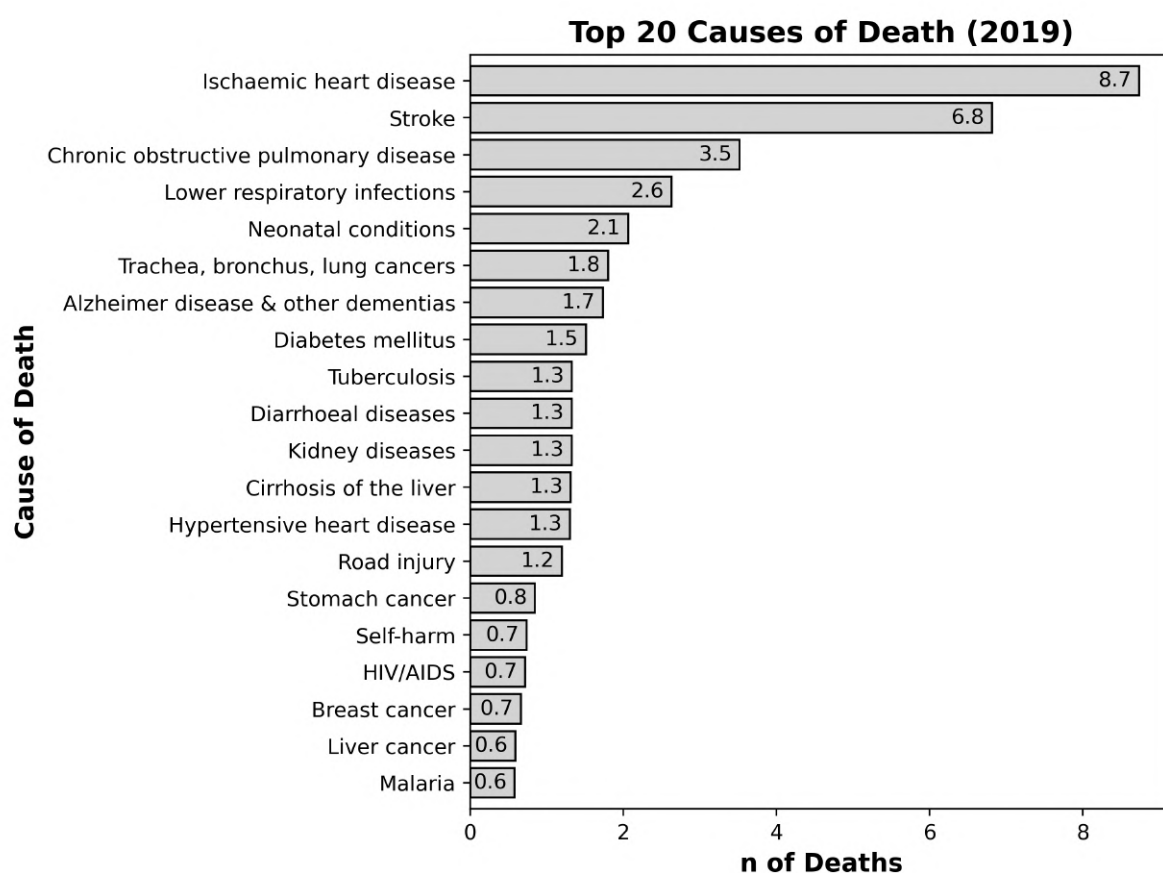


図1-2 世界における死因別死者数（文献14のデータから作成）

2019年における世界の死因別死者数。縦軸は死因、横軸は死者数を表す。

細菌感染症は個人の健康問題にとどまらず、社会全体に医療費の増大や経済活動の停滞、社会不安の増大など広範な影響を及ぼす。そのため、感染症対策として予防接種の推進、衛生環境の整備、正確な情報提供、そして疾患の確実な治療のために、何よりも早期診断と適切な抗菌薬の使用が重要である。細菌感染症においては、適切な抗菌薬の選択が治療効果を大きく左右する。迅速で正確な診断は、医師が最適な抗菌薬を選択し、耐性菌の発生を抑制するために不可欠である。

1.1.2. 細菌の生物学的特性と人間社会への影響

細菌は地球上で最も古い生物の一つであり、約35億年前に出現したとされる¹⁸。細菌は原核生物に分類され、真核生物である人間の細胞とは異なり、核膜を持たない単細胞生物である¹⁹。大きさは0.1～5 μm程度であり、染色を行った標本は光学顕微鏡での観察が可能である²⁰。生存と増殖に必要な機能は細胞膜や細胞壁によって維持され、細胞質内には遺伝情報を担うDNAやタンパク質を合成するリボソームなどが存在する。その増殖は主に二分裂による無性生殖によって行われ、栄養素、温度、pH、大気組成などの環境要因が増殖速度に大きく影響を及ぼす²⁰。

細菌は高速な増殖による遺伝的変異や細菌間での遺伝子水平伝播を通じて、多様な形態や機能を獲得してきた²¹。エネルギー獲得においても、光合成や有機物・無機物の酸化還元反応など、その方法は多岐にわたる。この高い環境適応能力により、生態系の様々なニッチを占有し、抗生物質への耐性獲得や新規代謝経路の獲得を可能としている²¹。

ヒトとの関係においては、細菌は深刻な疾患を引き起こす存在である。コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) や赤痢菌 (*Shigella*属)、サルモネラ菌 (*Salmonella*属) などは消化器系を侵襲して激しい下痢や脱水を招き²²、破傷風菌 (*Clostridium tetani*) やジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) は特異的な毒素を分泌して宿主組織を損傷させる²³。これら病原菌はヒトや動物の免疫系を回避しながら増殖し、宿主であるヒトに対して重篤な症状を惹起させる。このような病原性を示す細菌が存在する一方で、腸内細菌叢のように宿主の生命活動に不可欠な存在も多い。特に腸内細菌は、消化吸収の補助、免疫機能の調節、ビタミン合成など、多様な生理的機能を担っている²⁴。また、乳酸菌に代表される有用細菌は発酵食品の製造や醸造産業において重要な役割を果たし、食品産業において重要な役割を果たしている²⁵。これらは細菌の持つ代謝機能を有効に利用している例である。細菌の多様性とその人間・動植物への影響を理解することは、感染症対策や医療、食品産業など多くの分野で重要であると言える。

1.1.3. 敗血症の病態生理

敗血症とは、感染症に起因して生体における全身的な炎症反応が過剰に発生し、その結果として臓器不全や生命に危険を及ぼす状態を指す²⁶。これは、生体の免疫応答が制御不能となり、自己組織への損傷を引き起こすことによって生じる²⁶。敗血症の定義は時代とともに変遷してきたが、概ね感染症が疑われる、または証明されている状況下において臓器不全を伴う状態とされる²⁶。臓器不全の評価にはSOFA (Sequential Organ Failure Assessment) スコアが用いられ、このスコアの急激な上昇が敗血症を示唆する²⁷。敗血症の原因となる微生物としては、グラム陽性菌およびグラム陰性菌を含む細菌が最も一般的であるが、真菌やウイルスによる場合も存在する。これらの病原体が血液中に侵入することにより、炎症性サイトカインの放出や補体系の活性化を介して全身性の炎症反応が引き起こされる。治療法としては、感染源の早期同定と抗菌薬の投与が中心となり、同時に臓器機能を支持するための集中治療が必要である²⁶。また、敗血症性ショックにおいては血圧低下や循環不全が顕著となるため、輸液や昇圧薬の使用が行われる²⁶。敗血症の予後は適切な治療を施しても依然として高い死亡率を伴うため、早期診断と介入が極めて重要である²⁶。このため、敗血症に対する迅速な診断法や治療法の開発は医学研究の1つの重要な課題となっている。

1.1.4. 臨床現場における細菌感染症診療の現状

20世紀に入り抗生物質が発見されて以降、感染症の多くは治療可能となったが、現在でも世界の主要な死因の一つである²⁸。感染症の治療においては、原因病原体の特定と患者の全身状態評価に基づく、適切な治療法の選択が不可欠である。細菌感染症では特に、早期の適切な抗菌薬使用が治療効果を左右する²⁹。抗菌薬は作用機序により、細胞壁合成阻害 (β-ラクタム系)、タンパク質合成阻害 (マクロライド系、アミノグリコシド系)、DNA複製阻害 (キノロン系) などに分類される。これらの抗菌薬は、それぞれ特徴的な作用機序により細菌の増殖を抑制または殺菌する³⁰。

感染症治療の効果を最大化するためには、迅速な診断と病原体の同定、そして適切な抗菌薬の選択が重要であり、そのためには原因菌の早期特定とその感受性の評価が必須である²⁹。しかし同時に、不適切な抗菌薬使用は耐性菌出現のリスクを高めるため、適正使用の推進が求められてもいる。

従来の細菌培養検査や薬剤感受性試験には、細菌を培地上で培養し分離同定するための時間を要するため、医療現場では患者の症状、臨床所見、疫学的情報を総合的に判断し、原因菌同定前に抗菌薬投与を開始する経験的治療（*empiric therapy*）が一般的な対応となっている³¹。抗菌薬の効果判定は通常、治療開始から数日後に行われる。経験的治療における抗菌薬選択では、感染部位、症状の重症度、患者背景、地域の耐性菌動向などを考慮する必要がある³²。例えば市中肺炎では、主要な原因菌である肺炎球菌をカバーする抗菌薬が選択され、尿路感染症では大腸菌などのグラム陰性桿菌に有効な薬剤が優先される³³。初期治療では十分量の抗菌薬を適切な期間使用することが重要で、不十分な投与量や不十分な投与期間は避けなければならない³⁴。

治療プロセスとしては、まず初期評価としてバイタルサインのチェックと問診による症状の把握、そして身体診察による全身状態評価を行う。そして血液検査によって体内における炎症所見や感染所見、局所の臓器損傷所見を検査し、さらに検体が得られればグラム染色による鏡検所見、感染が疑われる臓器によっては必要であれば血液ガス分析やX線、CTや超音波などの画像検査を行う^{26, 31}。これらの所見を総合して、診察にあたる医師は感染の原因菌を推定し、経験的治療を開始することとなる。これらの抗菌薬治療と並行して、患者の全身管理も重要である³¹。発熱や消化器症状による脱水に対する輸液療法、低酸素血症に対する酸素療法など、病態に応じた支持療法を実施する。また、適切な栄養管理により免疫機能の維持と回復を促進することも重要である³¹。初療から数日後の治療効果判定によって症状が改善しない場合には検査を追加し、必要であれば抗菌薬をより広域のものに変更（*escalation*）する。また症状が改善傾向で微生物検査結果の判明後には、原因菌と薬剤感受性に基づき、可能であればより狭域で効果的な抗菌薬に変更（*de-escalation*）する^{26, 31}。これは患者の副作用発生の予防や、耐性菌抑制の観点からも重要である。ただし、MIC（最小発育阻止濃度）の数値のみにとらわれず、薬剤の特性（組織移行性、PK-PD特性）や投与量も考慮して適切な薬剤を選択する必要がある³⁵。

このように、臨床現場では診断の遅延による治療開始の遅れや、広域抗菌薬の過剰使用による耐性菌の増加など、複数の課題が存在する。特に薬剤耐性（AMR: Antimicrobial Resistance）は世界保健機関（WHO）も警鐘を鳴らす世界的な健康危機となっている³⁶。これらの問題に対し、抗菌薬適正使用プログラム（Antimicrobial Stewardship Program, ASP）の導入^{37, 38}や医療従事者への教育強化³⁹など、様々な取り組みが進められている。感染症の迅速診断技術の開発は、これらの課題を解決する重要な手段として期待されている。

1.2. 研究の動機

1.2.1. 現場における問題点

前節では医療現場における感染症治療の現状について概説したが、本節ではそれによる課題について掘り下げる。

まず、細菌感染症においては迅速な診断の困難さが最も深刻な問題である。従来の培養検査は結果が得られるまでに数日を要するが、特に敗血症においては、適切な抗菌薬の投与が遅れることで1時間あたり7～8%の死亡率上昇につながるため^{26, 40}、迅速な診断と治療開始の重要性が強調されている。加えて、培養が困難な細菌や抗菌薬投与後の患者からの検出には限界があり、正確な原因菌の特定が困難な場合も多い⁴¹。

次に、診断の遅れに伴う重症化を避けるため、医師は経験的に広域スペクトルの抗菌薬を投与せざるを得ない場合が多いという状況がある。原因菌が特定されていない状態で広範囲の細菌をカバーするためのこの措置は、必要以上に強力な抗菌薬の使用を促進し、耐性菌の出現を助長する要因となるという側面がある⁴²。抗菌薬耐性菌の増加は治療選択肢を狭め、感染症の重症化や死亡率の上昇を引き起こすだけでなく、不適切な抗菌薬使用や診断の遅れによる入院期間の延長を招き、医療費の増大をもたらす。特に耐性

菌感染症の治療には高額な抗菌薬の使用や長期の入院加療が必要となり、医療経済的な負担が顕著である⁴³。

さらに、質量分析法やPCR法などの先進的な微生物診断技術は高感度・高特異性を有するものの、専用機器や熟練した技術者を必要とし、導入コストが高額である⁴⁴。このため中小規模の医療機関や資源の限られた地域では利用が困難であり、診断の地域格差が生じている⁴⁵。一部の感染症では迅速診断キットが実用化されているが、多くの病原細菌については現場での迅速診断が実現しておらず、また現存する迅速診断キットも感度・特異度に課題が残るものも多い⁴⁶。

また、多くの診療所では微生物検査室を持たない施設も多く、外部の施設による検査では検体の搬送や結果の報告に時間を要する場合がある⁴⁷。さらに微生物検査室がある医療機関であっても24時間体制での検査対応は困難な施設も多く、夜間や休日の迅速な診断は困難である。特に離島や過疎地域では検体の搬送に時間がかかり、迅速な診断が一層困難となっている⁴⁸。

医療現場の負担増大も重大な問題である。高齢化社会の進行に伴い感染症患者の数は増加傾向にあるが、医療従事者の数はそれに追いついていない⁴⁹。感染症対策に要する時間や労力が増大し、医療従事者の負担が増加している⁵⁰。特に院内感染対策では、保菌者のスクリーニングや監視培養が重要な役割を果たすが、結果が出るまでの数日間は適切な隔離措置の判断が困難であり、MRSAなどの耐性菌に関しては診断の遅れが感染拡大のリスクを高めている⁵¹。

最後に、新興感染症や未知の病原体への対応の遅れが指摘される。グローバル化や気候変動の影響により、新たな感染症の出現や既存病原体の地域的拡大が進行しているが、これらに迅速に対応できる診断技術や治療法の整備が不十分である場合、パンデミックのリスクが高まる⁵²。

以上の問題点は、感染症診療における迅速かつ正確な診断技術の開発が急務であることを示している。特に、操作が簡便で導入コストが低く、信頼性の高い診断装置の開発が求められる。同時に、抗菌薬の適正使用を促進し、耐性菌の拡大を防ぐための技術的および制度的基盤の整備も重要である。

1.2.2. 医師主導の医工連携研究の意義

感染症診療における課題の解決には、医学と工学の融合的なアプローチが不可欠である。従来、このような異なった分野の融合は、それぞれの専門家の協力によって進められてきた⁵³。しかし医療機器開発においては、臨床現場のニーズを深く理解し、かつ工学的な実現可能性を見極められる人材の存在が、より効果的な技術開発につながると考えられる。

筆者自身の医工連携による技術開発の実績として、蛍光色素を用いた非侵襲的な造影装置を研究開発してきた経緯がある。このプロジェクトでは、医師として現場の課題を踏まえた上で、工学的な技術開発に直接携わり、医学的知識と工学的技術を組み合わせることで、臨床現場のニーズに即した製品開発を実現し、試作から製品化までの全過程を完遂した。医療現場のニーズを工学的なソリューションに効果的に反映できることを実証できたという経験は、本研究における感染症診断装置の開発を始めるにあたって、大きな動機の一つである。この経験を通じて得られた、技術的課題の克服から事業化戦略の立案に至る総合的な知見は、本研究における新たな診断技術の開発という面においても重要な示唆を与えるものであった。この経験においては異分野の技術を医療に応用する際の課題やその解決策、製品化に向けた具体的なアプローチなど、実践的なプロセスに基づいた観点からの知見をプロダクトに反映することの困難さを実感した。また、従来の医療機器開発の常識や固定観念にとらわれない、異分野からの柔軟な発想を取り入れることの重要性も認識した。これらの経験は、本研究開発においても、基礎研究から実用化までの過程で有用な指針となると考えられる。現場で働く者は、基礎研究で有望な結果が得られた診断技術であっても、臨床現場特有の様々な要因により、実用化の段階で本来の性能を発揮できないことがあることを度々経験する。これらの要因、例えば検体の品質のばらつき、共存物質の影響、環境要因など、現場の環境に起因する実践的な課題を開発初期段階から考慮することが重要である。

また新規技術を用いたプロダクトの開発において、導入・運用コストと得られる臨床的利益のバランスを考慮することは重要である。高額な診断装置は中小規模の医療機関での導入が困難であり、結果として診療格差を生むことにつながる。また、高性能な診断装置であっても、操作が複雑であったり、結果の解

釈に専門的知識を要する場合、実臨床での活用が限定的となることがある。さらには、いかに革新的な技術を用いたものであったとしても、得られた結果による臨床的な意義が乏しければユーザーは利用価値を見出すことができない。臨床医の視点からこれらのバランスを考慮した装置開発を進めることができる。

以上より、臨床医が技術開発に関与する意義は、医療現場の具体的なニーズと技術的可能性を効果的に結びつけ、実用性の高い診断手法を確立できる点にあるといえる。しかしそれだけではなく、医師としての専門分野とは異なる診断装置の研究開発に主体的に開発に携わる理由は、上記のように現場の課題を深く理解し、具体的な解決策を提供することで、医療の質を向上させることができるという自負とともに、患者の負担を軽減し、治療効果を最大化するための手法を追求せねばならないという使命感にもある。自らの経験と知識を活かし、医療と技術開発との架け橋となることで、感染症治療に少しでも貢献したい。

1.3. 研究の目的と方法

1.3.1. 自家蛍光分析と機械学習を用いた細菌同定システムの研究開発

本研究の技術的目標は、自家蛍光スペクトルを解析することによる迅速な菌種同定結果の提供を実現する機器を開発することである。これにより、従来の培養検査で数日を要していた診断プロセスを大幅に短縮し、適切な抗菌薬選択の迅速化を可能にすることを目標とする。研究の新規性は、細菌固有の自家蛍光特性を分析する機械学習の学習過程や波長ごとの精度を解析することにより、菌種同定に最適化した分光計測手法およびハードウェアの開発という点である。

本研究では、以下の3つの段階で系統的な検討を行う。まず第一段階として、臨床的に重要な複数の菌種について、蛍光分光光度計を用いた自家蛍光スペクトル自体の特性を解析する。各菌種の培養条件の最適化、サンプル調製法の確立、および測定条件の標準化を実施する。さらに、得られたスペクトルデータに対して適切な前処理および規格化を行い、菌種特異的なスペクトルパターンの抽出を試みる。

第二段階では、取得したスペクトルデータに対して機械学習アルゴリズムを適用し、高精度な菌種判別モデルを構築する。まず、データの前処理として次元削減やノイズ除去などの最適化を行い、機械学習に適したデータセットを作成する。次に、複数の機械学習アルゴリズムを比較検討し、本課題に最適なモデルを選定する。モデルの評価には交差検証を用い、精度、感度、特異度などの指標を用いて総合的な性能評価を行う。さらに、モデルの汎化性能を向上させるため、ハイパーパラメーターを最適化する。

第三段階では、同定精度に影響を与える要因を系統的に解析する。励起波長の選択、スペクトル分解能、検出感度などの光学的パラメーターが診断精度に与える影響を定量的に評価する。これらの結果に基づき、実用的な診断システムの設計指針を確立する。

1.3.2. 実用化に向けた開発戦略と事業化計画

本研究で開発する診断システムの実用化には、技術開発のみならず医療機器としての製品化に向けた包括的な取り組みが必要である。そのため、以下の3つの観点から実現可能性について検討する。

第一に、医療機器としての製品化に必要な技術要件の整理である。光学系の設計、データ処理系の構築など実用化に向けた技術的課題を明確化する。また、3章までの基礎的な研究成果を踏まえ、臨床現場での使用に耐えうる実用的な装置の設計要件を具体化する。Light Emitting Diode (LED) 光源の選定と最適化、検出器の要件など、工学的な観点から実装上の課題を整理し、コストと性能のバランスを考慮した現実的な解決策を提示する。

第二に、薬事承認取得に向けた要件の検討である。本装置は体外診断用医療機器として、その有効性と安全性を客観的に検証する必要がある。そのため、性能評価試験のプロトコル策定、必要な技術文書の整備、品質管理体制の構築など、承認申請に向けた具体的な要件を明確化する。

第三に、事業化に向けた実現可能性の評価である。まず、市場分析を通じて製品の競争優位性を評価し、研究開発から製品化までの具体的なロードマップを策定する。特に、既存製品との差別化要因、想定される販売価格、製造コスト、必要な設備投資などについて詳細な検討を加える。また、製造・販売体制の構築、必要な資金調達など、事業化に向けた具体的な課題を整理する。

本研究を通じて、基礎研究の成果を実用的な医療機器として社会実装するために必要な要件を多面的に検討し、実現可能な開発・事業化戦略を提示することを目指す。

1.4. 論文の構成

本論文は全6章から構成される。1章として、前節までの記述において研究の背景と目的を述べ、感染症診療における現場の課題と、それに対する新たなアプローチの必要性を明らかにした。細菌の自家蛍光特性と機械学習を組み合わせた迅速な菌種同定装置の開発を目指す理由を示した。2章では、細菌の自家蛍光特性および分光計測技術に関する基礎を概観した上で、自家蛍光物質の種類や発光メカニズム、分光計測の原理について詳述し、本研究の技術的背景を整理する。また細菌検体を培養し、試料を準備し、実際に自家蛍光スペクトルを計測する実験系の構築と、計測したデータの解析を行う。3章では、取得した自家蛍光スペクトルデータを用いて、機械学習による菌種同定モデルの構築と評価を行う。データの前処理方法、特徴抽出手法、機械学習アルゴリズムの選択と最適化について述べ、モデルの識別精度を検証する。4章では、実際の臨床応用を目指した分光計測装置の設計と開発について詳述する。光学系の設計、光源と検出器の選定、装置の小型化と操作性の向上に関する取り組みを紹介し、試作機の性能評価結果を報告する。5章では、開発した装置の社会実装に向けた取り組みとして、市場分析とビジネスプランの策定を行う。市場性や競合状況の把握、ビジネスモデルの構築、事業化戦略について考察し、技術開発と事業化を統合するアプローチを提案する。最後に6章では、本研究の成果を総括し、設定した課題に対する回答を示すとともに、今後の展望と残された課題について述べる。

以上に述べた本論文の全体構成を図1-3に示す。

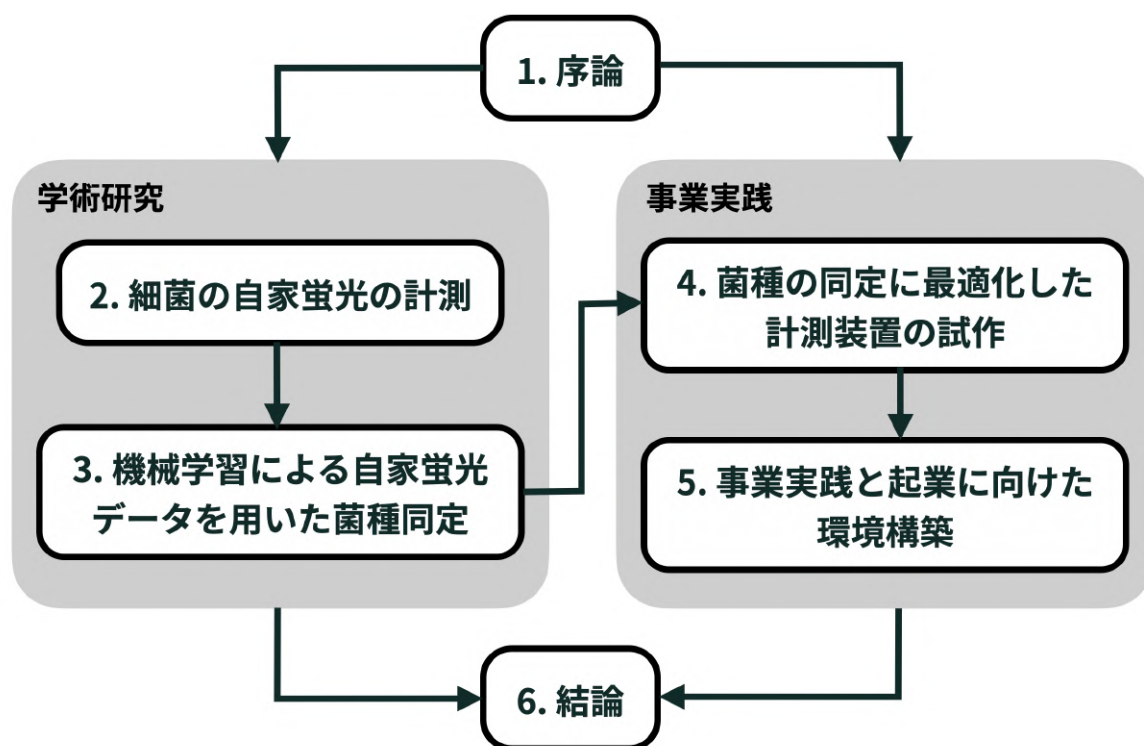


図1-3 論文の構成

本論文の全体構成のシェーマ。学術研究と事業実践の2つの領域について研究と実践を行った。

-
- ¹ Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th ed. Elsevier; 2016.
- ² Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430(6996):242-249.
- ³ Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020.
- ⁴ Häggström M. Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *Wiki J Med*. 2014;1(2).
- ⁵ Fleming A. Nobel Lecture: Penicillin. NobelPrize.org. 1945. : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/> (2024/12/8アクセス) ..
- ⁶ Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1:134.
- ⁷ Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*. 1999;282(7):677-686.
- ⁸ Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-993.
- ⁹ Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417-433.
- ¹⁰ Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge. *N Engl J Med*. 2009;360(5):439-443.
- ¹¹ Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1057-1098.
- ¹² Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect*. 2015 Mar;17(3):173-83.
- ¹³ Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:321-42.
- ¹⁴ Casadevall A, Pirofski L. 1999. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect Immun* 67:..<https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999>.
- ¹⁵ WHO 「The top 10 causes of death」 : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2024/11/28アクセス) .
- ¹⁶ Rudd, K. E., et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 395(10219), 200-211.
- ¹⁷ Centers for Disease Control and Prevention 「Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019」 : <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> (2024/11/28アクセス) .
- ¹⁸ Allwood AC, Walter MR, Kamber BS, Marshall CP, Burch IW. Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*. 2006;441(7094):714-718.
- ¹⁹ Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 6th ed. Garland Science; 2014.
- ²⁰ Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Biology of Microorganisms. 14th ed. Pearson; 2014.
- ²¹ Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000;405(6784):299-304.
- ²² Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *The Lancet*. 2012;379(9835):2466-2476.

-
- ²³ Silva HJ, Giulietti AM, Segovia RF, Ertola RJ. [Use of molasses and whey in culture media for the development and production of a toxin from *Clostridium perfringens* type D]. *Rev Argent Microbiol.* 1982;14(2):85-90.
- ²⁴ Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* 2014;63(12):1913-1920.
- ²⁵ Endo A. Diversity of lactic acid bacteria in fermented products. Functional Foods Forum, University of Turku, Itäinen Pitkätatu 4 A, 5th floor, 20014 Turku, Finland.
- ²⁶ Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-810.
- ²⁷ Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* 1996;22(10):707-710.
- ²⁸ Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet.* 2020;396(10258):1204-1222.
- ²⁹ Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*: *Critical Care Medicine.* 2006;34(6):1589-1596.
- ³⁰ Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health.* 2021;14(12):1750-1766.
- ³¹ Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2016. *Intensive Care Med.* 2017;43(3):304-377.
- ³² Kollef MH. Optimizing antibiotic therapy for severe infections: an update. *Chest.* 2015;147(2):402-410.
- ³³ Metlay JP, Waterer GW, Long AC, et al. Diagnosis and Treatment of Adults with Community-acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):e45-e67.
- ³⁴ Boucher HW, Talbot GH, Benjamin DK Jr, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
- ³⁵ Tsai D, Lipman J, Roberts JA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations for the optimization of antimicrobial delivery in the critically ill: Current Opinion in Critical Care. 2015;21(5):412-420.
- ³⁶ Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057-1098.
- ³⁷ World Health Organization. “Antimicrobial Resistance.” <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515481> (2024/12/8アクセス).
- ³⁸ Centers for Disease Control and Prevention. “Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs.” <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/hcp/core-elements/hospital.html> (2024/12/8アクセス).
- ³⁹ Wagner B, Filice GA, Drekonja D, et al. Antimicrobial stewardship programs in inpatient hospital settings: a systematic review. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(10):1209-1228.

-
- ⁴⁰ Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1589-1596.
- ⁴¹ Man M, Shum H, Li K, Yan W. Impact of appropriate empirical antibiotics on clinical outcomes in *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *Hong Kong Med J*. Published online August 13, 2021.
- ⁴² Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, et al. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2010;170(4):343-350.
- ⁴³ Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655.
- ⁴⁴ Dixon P, Hollingworth W, Pike K, Reynolds R, Stoddart M, MacGowan A. Cost-effectiveness of rapid laboratory-based mass-spectrometry diagnosis of bloodstream infection: evidence from the RAPIDO randomised controlled trial. *BMJ Open*. 2021;11(10):e044623.
- ⁴⁵ Okeke, I.N., Ihekweazu, C. The importance of molecular diagnostics for infectious diseases in low-resource settings. *Nat Rev Microbiol* 19, 547–548 (2021).
- ⁴⁶ Bouzid D, Zanella MC, Kerneis S, et al. Rapid diagnostic tests for infectious diseases in the emergency department. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(2):182-191.
- ⁴⁷ Maillet É, Paré G, Currie LM, et al. Laboratory testing in primary care: A systematic review of health IT impacts. *International Journal of Medical Informatics*. 2018;116:52-69.
- ⁴⁸ Bhatt RD, Shrestha C, Risal P. Factors affecting turnaround time in the clinical laboratory of the kathmandu university hospital, nepal. *EJIFCC*. 2019;30(1):14-24.
- ⁴⁹ World Health Organization (WHO). Global strategy on human resources for health: Workforce 2030. World Health Organization. 2016.
- ⁵⁰ World Health Organization (WHO). Global health and aging. World Health Organization. 2011.
- ⁵¹ Bradley CW, Wilkinson MAC, Garvey MI. The effect of universal decolonization with screening in critical care to reduce mrsa across an entire hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38(4):430-435.
- ⁵² Flahault A, de Castaneda RR, Bolon I. Climate change and infectious diseases. *Public Health Rev*. 2016;37(1):21, s40985-016-0035-2.
- ⁵³ Smith L, et al. Biomedical engineering: a historical perspective. *J Med Eng*. 2018;25(2):123-145.

2. 細菌の自家蛍光の計測

本章では単離した細菌を対象とした自家蛍光の計測について詳述する。本章の主な研究目的は、蛍光分光光度計を用いて細菌の自家蛍光を正確に計測するための実験環境を構築することにある。さらに、計測した蛍光スペクトルから各菌種に固有の蛍光パターンを特定できるかを検証し、これにより3章で行う機械学習のための細菌自家蛍光データベースの基盤を作成することを目指す。

まず有機物の測定手法と自家蛍光の特徴について概説し(2.1)、続いて細菌サンプルの準備方法(2.2)、蛍光分光光度計を用いたサンプルの計測手法およびデータ解析の手順(2.3)、最後に菌種間で観察される自家蛍光の差異についての実験結果を記述する(2.4)。

2.1. はじめに

本節では有機物の測定手法に関する基本的な概要を紹介し、特に分光計測が果たす役割とその位置づけについて詳述する。次に、蛍光分光法の基本原理とその特性について解説し、この手法が持つ分析能力の強みと限界を明らかにする。さらに、細菌の自家蛍光現象の原理と特徴について論じ、自家蛍光が菌種同定においてどのように活用されるかを具体的に説明する。最後に、蛍光分光光度計の構造およびその特徴について述べる。

2.1.1. 有機物の測定手法の概要と分光計測の位置づけ

有機物の定性検査手法には多様なアプローチが存在するが、それぞれの手法によって異なる特徴と利点がある。有機物分野で主に用いられるのは大きく分けて1.質量分析法、2.核磁気共鳴法、3.種々の分光法の3つである¹。

1. 質量分析法 (Mass Spectrometry, MS) では試料をイオン化し、その質量と電荷の比 (m/z) を測定する。特に複雑な有機分子の同定や定量に優れているが、装置の高価さや操作の複雑さが課題となる²。
2. 核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) は原子核のスピンを利用して分子内の化学環境を解析する手法である。NMRは有機分子の構造解析に極めて有用で分子の詳細な構造情報を得るのに適しているが、試料量が多く必要である点、特定元素のみにしか適用できない点、装置が大掛かりな点、試料全体の平均の値としてしか検査結果を出力できない点などの制約も多い³。
3. 分光計測法 (Spectroscopy) には対象とする計測物質や溶媒に応じて主に赤外分光法 (Infrared Spectroscopy) と紫外可視分光法 (UV-Vis Spectroscopy) がある他、特殊な計測手法として蛍光分光法 (Fluorescence Spectroscopy)、Raman分光法 (Raman Spectroscopy)、蛍光寿命測定 (Fluorescence Lifetime Imaging)、レーザー誘起破壊分光法 (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) など、独自の特性を持つ様々な検査方法が存在する⁴。MSやNMRの検査装置と比較すると相対的に小型化が可能で可搬型のものも存在する。またこれらの分光計測技術は試料に対して様々な波長で計測することで、より詳細で総合的な分析が可能となる。このように有機物の定性検査手法は用途や目的に応じて適切なものを選択する必要がある、それぞれの手法の特徴を理解した上で、最適なアプローチを見極めることが重要である⁵。

特に分光計測法は試料に対する非破壊的な測定が可能であり、装置の簡便さや感度の高さから、迅速かつ精度の高い分析を求められる場面で優位性を発揮することが多い。今回の研究の主な測定方法として用いている蛍光分光法はこの分光計測の一種で、分子が特定の波長の光を吸収しその後異なる波長の光を放出する性質を利用するものであり、一般的には有機物中の蛍光物質の特性を調査するのに用いられる。光の吸収ではなく蛍光の発光を検知するという検査特性によって微量な試料でも高感度に検出でき、比較的濃度の低い生物学的試料や環境サンプルの分析において有用であることが多い⁶。蛍光分光法に使用される装置は他の分光計測法よりも単純で操作自体も複雑な手順を要さず、また装置全体が小型の装置が多く、実験室や現場での使用においても取り扱いが容易であるとされる。また、サンプルの準備が簡単で、迅速に測定を開始できる点も特徴である。

2.1.2. 蛍光分光法の原理と特徴

蛍光とは、基底状態にある物質が特定の波長の光を吸収して一時的に励起され、基底状態に戻る際に照射された波長と異なる波長の光を放出する現象である。この現象は分子の電子状態の変化に基づいており、外部からの光、通常は紫外線や可視光の吸収によって始まる。この吸収により、分子内の電子が基底状態から励起状態へ遷移する。励起状態は一時的なものであり、分子は安定な基底状態に戻ろうとする過程で光を放出するが、この放出された光を蛍光と呼ぶ⁶。蛍光として放出される光の波長は吸収された光の波長よりも長くなる。これは吸収エネルギーの一部が振動エネルギーとして分子内で消失するためであり、Stokes Shiftと呼ばれる。また、蛍光は瞬時に発光するわけではなく、通常は数ナノ秒から数マイクロ秒の間持続する。この持続時間を蛍光寿命と呼び、物質の特性や環境条件に依存する。蛍光寿命は、分子が励起状態から基底状態に戻る速さを示す指標であり、物質の特性解析において重要な情報を提供する。さらに、蛍光の効率を示す指標として量子収率があり、これは吸収された光子のうち蛍光として放出された光子の割合を表す。高い量子収率を持つ物質は、より明るく強い蛍光を発することができる⁶。蛍光の基本原理は、分子が光エネルギーを吸収し、励起状態から基底状態に戻る際に光を放出する現象であり、物質の特性や環境条件に依存するもので、この蛍光を利用した化学計測は現在多くの分野で用いられている。

2.1.3. 自家蛍光の原理と特徴、菌種同定における利用

本研究では2.1.1.に記述した有機物定性検査方法の中から、対象とする有機物組成の複雑さ、臨床現場での使用を念頭に置いた場合のサンプル調製の容易さ、実験系の構築における装置のアクセス難度や価格を考慮し、主たる研究手法として細菌の発する自家蛍光の分光計測を用いることとした。自家蛍光とは生物や物質に外部からの蛍光物質の添加をせずに観察することのできる蛍光である。蛍光を発する物質の励起および発光波長は分子固有のものであり、特定の分子や細胞組織が持つ特徴的なスペクトルを反映する⁷。特に自家蛍光は紫外や可視光領域で励起される物質が多く、赤外光のようにサンプルの媒質である水の影響を受けずに計測できる点も、今回の実験系の構築においては有用であった。

自家蛍光の生物学的起源には様々な生体分子が含まれるが、代表的なものには例えば次のような分子が挙げられる。(i) Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)：細胞内でのエネルギー代謝に関与、(ii) Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)：酸化還元反応に関与、(iii) 膠原線維：組織の構造を形成、(iv) Elastin：結合組織に含まれ組織の構造形成に関与、(v) Lipofuscin：老化や酸化ストレスによって蓄積⁸。自家蛍光の最大の利点は、標識物質や蛍光染料を別途追加する必要がないため、サンプルをこれらの追加の物質と反応していない自然な状態で観察できることで、生きた細胞や組織をそのまま観察することが可能であり、蛍光標識の導入による細胞機能への影響を避けることができる。またサンプル準備の時間やコストを削減できる点もメリットの1つである⁸。

菌種同定手法においては、これら自家蛍光物質のうちで細菌がその構造体内に内因性に保持しているNADH、FAD、porphyrinなどの蛍光特性を利用する⁹。対象の細菌に特定の波長の励起光を照射し、その際に放出される蛍光スペクトルを測定することで、細菌種ごとの異なるパターンを基に同定する。励起光は紫外領域から可視光領域にかけての波長帯でいくつかの相違点が観察されることが報告されている⁹⁻¹⁰。これらの特徴を生成する原因となる細菌の細胞壁構造や、あるいは代謝状態、成長段階、環境ストレスなどによる自家蛍光特性の時間的な変化などについても研究されている。つまり自家蛍光を計測することで得られるスペクトル情報には、菌種だけでなく細菌の状態や環境への応答に関する情報も内包されている可能性が示唆されている¹¹。実際に、細菌の自家蛍光を利用して菌種を診断した研究もいくつか報告されている。過去の報告では、励起蛍光マトリクスによって得られたシグナルに数学的処理を適用することで、菌種の同定精度が向上することが示された。特に主成分分析を活用した研究では、90 %以上の感度と特異度で菌種を特定できたとされている¹²。これらは従来の手法で必要とされる蛍光標識や抗体などによる細菌の副次的な変化を除外でき、直接的に生きた菌の状態変化を測定できるという自家蛍光の計測

による利点である。一方で自家蛍光を用いた菌種同定において、その同定精度と励起波長、およびその数についての研究は、まだ詳細に行われていない。

また肉眼的な観察だけでは差異がほとんど判別できないようなスペクトルデータに対して、機械学習アルゴリズムと組み合わせて差異を分析する手法も提案されており¹³、95 %以上の精度で同定が可能だったとする報告もある¹⁴。本研究でも第3章において自家蛍光データに対する機械学習アルゴリズムの適用について実験と検討を行っている。またこれら自家蛍光と機械学習を用いた菌種同定において、計測効率を上げて検査のスループットを向上させるために、その同定精度と励起波長、およびその個数に関する関係性についての研究は詳細に行われていない。第3章では、これらについても検討を行っている。

2.1.4. 蛍光分光光度計の構造と特徴

励起光を利用して物質の蛍光特性を計測する代表的な装置が蛍光分光光度計である。通常の蛍光分光光度計は、特定の波長の励起光を試料室内のサンプルに照射し、発生した蛍光を検出器にて検出し得られた信号をスペクトルデータとして出力する構造を持つ（図2-1）。

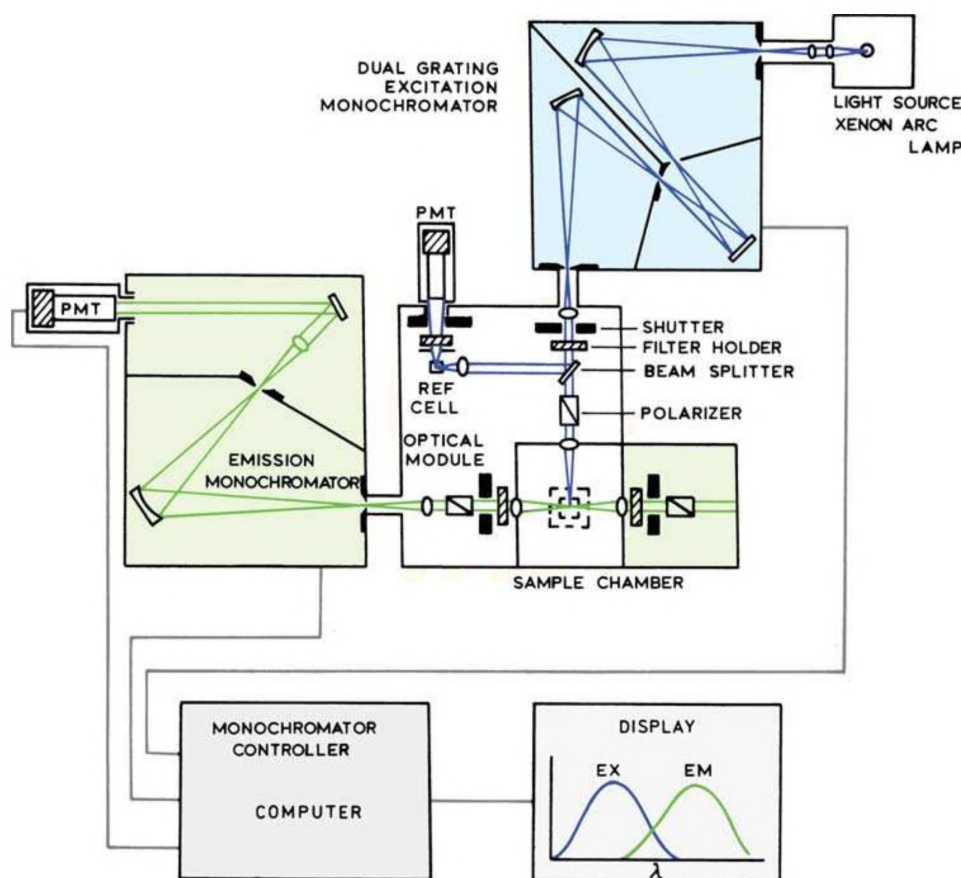


図2-1 蛍光分光光度計の模式図（文献7から引用）

蛍光分光光度計の原理を示した模式図。

まず図右上の光源から照射された励起光が分光器内で分光され、図中央の試料室内の試料に照射される。照射光の光軸と直交する光軸で集光された蛍光は、図左の分光器内で分光され、光電子増倍管で検出される。光電子増倍管の信号は計算機に送信され、ディスプレイに表示される。

光源は通常重水素ランプやキセノンランプなどの白色広帯域光源が用いられ、光源からの光はモノクロメーターを通じて特定の波長に分光される。光源からの励起光は試料が配置された試料室に照射され、試料室に静置されたサンプルはこの励起光を吸収し蛍光を発する。試料室内には蛍光の効率的な収集を可能にするためしばしば光学素子が配置されている。また固体、液体、あるいは気体などそれぞれの試料の状

態に応じた試料室が設計される。この試料が発した蛍光は、通常励起光の直接的な干渉を最小限に抑えるために試料室から90度の角度で収集され、分光器や光学フィルターを通して特定の波長に選別され、モノクロメーターあるいはポリクロメーターに到達する。この検出器には蛍光強度に応じてフォトダイオードや光電子増倍管、リニアCCDセンサーなどが選択され、微弱な蛍光信号を高感度に検出するために一般的には高感度のものが使用されることが多い。検出された蛍光信号は検出器に応じた電気信号に変換されて計算機に送られ蛍光スペクトルとして表示される¹⁵⁻¹⁶。得られた蛍光スペクトルには、蛍光の強度や波長に関する情報が含まれており、これに基づいて試料の性質や濃度、化学状態などを解析することができる。照射する励起光の波長によって得られる蛍光スペクトルは変化し、励起波長順に蛍光スペクトルを整理して作成される励起波長と蛍光波長の相関図を励起蛍光マトリクス (Excitation Emission Matrix, EEM) と呼ぶ。EEMによって試料の特性に関する詳細な情報を更に細かく得ることができる¹⁷。

蛍光分光光度計にはその測定手法の特性による利点がいくつか存在する。まず非常に高感度であり微量の物質を検出するのに有用である。蛍光信号は通常、吸収スペクトルに比べて強く、バックグラウンドからのノイズと容易に区別できるため微量分析において優れている。ナノモルやピコモルレベルの濃度でも検出が可能で、医療や生化学研究において重要な役割を果たす。また蛍光分光法はサンプルを破壊せずに測定できる非破壊的手法であるため、生体サンプルや貴重な試料を繰り返し分析できる。また前述のように生きた細胞や組織のリアルタイムでの観察が可能であり動的なプロセスの観察に有用であること、サンプルをセットしてから短時間で測定結果を得ることができること、蛍光の発生自体が非常に高速なため、リアルタイムでのモニタリングや多検体の迅速な分析にも適していることなどが挙げられる。一方でいくつか制限も存在する。その原理上蛍光分光光度計で測定できる物質は蛍光を発する性質を持つ分子に限られるが、すべての物質が蛍光を発するわけではないため、蛍光性がない物質については他の手法を併用する必要がある。また蛍光性物質は長時間あるいは高強度の励起光照射により蛍光が徐々に減衰する光漂白という現象を起こす。これにより、長時間の測定や観察が困難になる場合がある。そして蛍光分光光度計の感度は、サンプルの温度、pH、溶媒条件などの環境要因に影響を受けることがある点も測定と結果の解釈においては注意が必要である¹⁸。

2.2. 細菌サンプルの準備

本節では細菌自家蛍光の計測に必要なサンプル準備方法について説明する。まず、研究対象とする菌株の選定と培養条件を最適化し、均一なサンプルを調製する手順を示す。次に、サンプルの濁度と菌数の関係を明確にするために検量線を作成し定量的な分析のための準備を行う。これらの準備過程により、信頼性の高い細菌サンプルを調整する環境を整える。

2.2.1. 菌株の選定と培養

本研究で使用する菌種は、まず臨床現場での分離頻度から候補を絞ったうえで、研究施設のバイオセーフティレベルと研究施設に準備できる培養環境の制約を考慮し、以下の10菌種を対象とした。なお*E. coli*と*P. aeruginosa*については菌株レベルでの同定率を検討するため複数の菌株を選択した。これらの選定基準に基づき、本研究では計測する対象の細菌株を表2-1に示すように10菌種14菌株とした。

表2-1 計測対象とした菌株のリスト

菌種名とそのATCC番号。

Species	ATCC no.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
<i>Escherichia coli</i>	8739
	25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Proteus mirabilis</i>	29245
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
	10145
	27853
	35422
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i>	14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	29970
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	46919
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615

細菌株の標本からサンプルを調整できる菌量を得るために、米国タイプカルチャーコレクション(ATCC)の標準プロトコルに従って、個体培地シャーレ上にストリーク法で塗抹した標本を培養した^{19,20}。

20 %グリセリン溶液に-80 °Cで凍結保存されたそれぞれの株の標本（菌株の一部は乾燥凍結標本から実験時に復元）について、*S. haemolyticus*のみ5 % ヒツジ血液寒天培地（BD BBL TSA II, Becton Dickinson、アメリカ）上に、それ以外の株は直接Luria-Bertani（LB）寒天培地（BD Difco LB、Becton Dickinson、米国）上に白金耳を使って1 gほどを培地の一端に滴下した。滴下部から区画に分けて菌を徐々に拡げていくことで、濃度を段階的に薄くし、この手順を繰り返して標本を培地全面に塗布した。*S. pneumoniae*と*S. pyogenes*は二酸化炭素培養器を用いて、それ以外の株は通常の恒温培養器を用いて37 °Cで24～48時間培養した（写真2-1）。

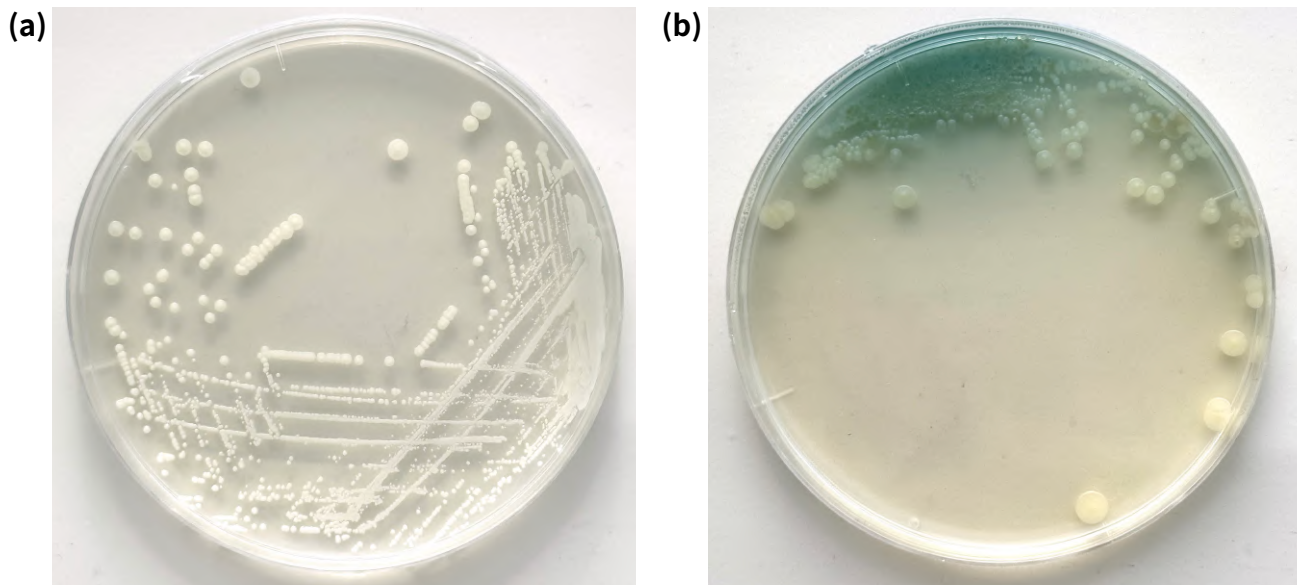


写真2-1 塗抹培養後のシャーレの外観

(a) *S. aureus*を塗布したLB培地のシャーレの外観。

(b) *P. aeruginosa*を塗布したLB培地。菌体の産生するPyocyaninによって、培地が部分的に緑色に着色されている。

2.2.2. サンプルの調製

2.2.1.によって培養したそれぞれの株のシャーレから、 $\phi 1$ mm程度に成長したコロニーを白金耳を用いて釣菌し、サンプル調製用の希釈溶媒として2 mlずつ分注しておいた室温の滅菌生理食塩水（純水1000 mlに対し塩化ナトリウム9 gを溶解しオートクレーブしたもの）に投入した。続いてボルテックスミキサで菌塊が目視できなくなるまでおよそ1～5分間攪拌して溶解させ、さまざまな濁度を持つ細菌懸濁液を1株につき40サンプルずつ調製した。サンプルの濁度は濁度計（Ultrospec OD600、Biochrom、英国）を用いて都度計測し、大まかに0.010から0.900までの範囲の分布となるように、釣菌するコロニー数と生理食塩水量とを適宜加減することで調整した（写真2-2）。



写真2-2 各濁度ごとの*S. aureus*のサンプルの外観

肉眼による濁度ごとのサンプルの外観。それぞれの濁度は左から0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9。

2.2.3. 菌種毎の検量線の作成

濁度はサンプル注に浮遊する細菌粒子によって生じる光の散乱具合を用いてサンプルの濃度を間接的に数値化しているにすぎず、サンプルに含まれる菌量と一定の相関はあるもののその係数は菌種によって異なる。各菌株ごとの濁度と菌数についての検量線を作成するため、株ごとに作成した40サンプルのうち20サンプルに対して希釈平板法とコロニーカウント法による菌定量²¹のための培養を行った。20サンプルそれぞれから0.1 mlを取り出し滅菌生理食塩水で 10^5 倍から 10^9 倍までの5段階に希釈し、作成したそれぞれの希釈液を0.1 mlずつ単独の培地に塗布して培養した。コロニーが肉眼で識別可能になるまで培養を行った後、シャーレ上のコロニー数をカウンタにより計測した（写真2-3）。

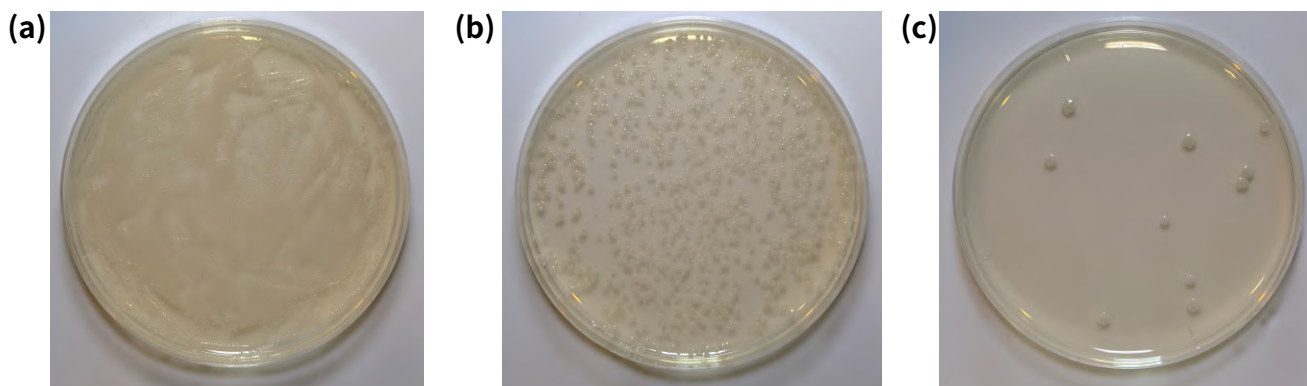


写真2-3 希釈平板法によって作成した各濃度のコロニーカウント用シャーレの外観

濁度0.25のサンプル原液を各倍率に希釈後、0.1 mlを塗布し培養したシャーレの外観。

- (a)10倍に希釈したもの。
- (b)10³倍に希釈したもの。
- (c)10⁵倍に希釈したもの。

各希釈倍率に応じてコロニー数は変動したが、カウント数と希釈倍率には概ね比例関係が認められた。希釈操作には、ピペッティングによる操作誤差および高濃度サンプルに起因するコロニーの過剰生成による誤差が影響することから、1シャーレあたりのコロニー数が50～500 CFUとなる希釈倍率を適正と判断し、その希釈倍率の結果をサンプルの菌量として採用した。なお、前後の希釈段階における数値と著しく乖離する外れ値は除外した。

実験によって、各菌種における濁度と菌濃度についての分布が得られた。各サンプルの濁度と菌濃度には濁度に応じた一定の相関が見られ、今回設定した0.1から0.9までの濁度の範囲では濁度と生菌数とが比例する傾向が確認された。この分布に対する一次近似をそれぞれに行い、各株における検量線を作成した(図2-2)。

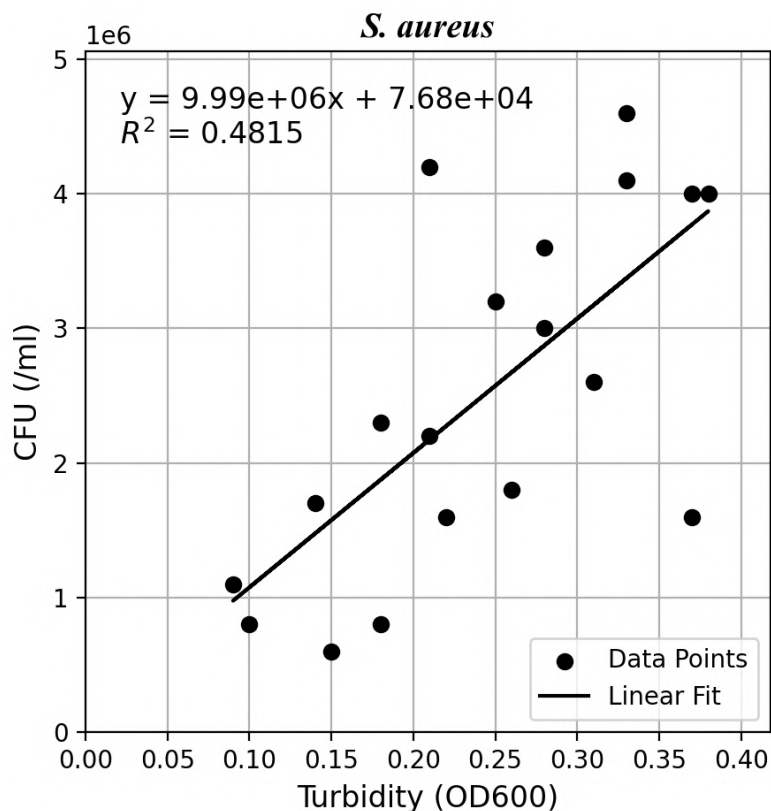


図2-2 濁度と菌量に関する検量線

*S. aureus*の各サンプルの濁度とカウントによって得られた菌濃度とのデータポイントの分布と、分布から一次近似される近似式のプロット。縦軸はカウントしたCFUから計算される元サンプルの菌濃度、横軸は濁度を表す。

得られた近似式を用いて各サンプルの生菌数を濁度から算出した。各菌株におけるサンプル数、濁度、算出された菌量のサンプル間での平均値と標準偏差を表2-2に示す。

表2-2 計測対象菌株毎のサンプルの濁度と菌量の統計

菌種名、ATCC番号、サンプル数、濁度と検量線の平均値と標準偏差。

Species	ATCC no.	n	Turbidity (OD600)		Calculated bacterial density (CFU/ml)	
			Mean	SD	Mean	SD
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	40	0.203	0.119	2.42E+07	9.01E+06
<i>Escherichia coli</i>	8739	40	0.238	0.124	4.15E+07	2.83E+07
	25922	44	0.261	0.128	4.42E+07	2.87E+07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	40	0.216	0.087	8.09E+06	1.90E+06
<i>Proteus mirabilis</i>	29245	41	0.286	0.216	3.45E+07	2.49E+07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	41	0.194	0.109	2.14E+07	1.43E+07
	10145	40	0.271	0.133	2.77E+07	1.63E+07
	27853	41	0.211	0.139	2.28E+07	1.68E+07
	35422	37	0.3	0.186	3.01E+07	1.68E+07
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i>	14028	40	0.342	0.208	2.87E+07	1.21E+07
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	49	0.237	0.138	2.44E+07	1.45E+07
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	29970	40	0.457	0.263	2.50E+07	2.02E+07
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	46919	41	0.192	0.157	2.90E+07	1.80E+07
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	40	0.147	0.100	1.48E+07	4.46E+06

2.3. 蛍光分光光度計によるサンプルの計測

本節では蛍光分光光度計を用いて細菌サンプルの自家蛍光を計測する手法について詳述する。まず実験のセットアップ方法と使用する装置の設定について解説し、次にデータの収集方法および前処理手順を述べ、最終的に得られた蛍光データの全体的な傾向について記述する。

2.3.1. 実験セットアップ

使用した蛍光分光光度計（FP8300、日本分光、日本）は、光源として150 Wキセノンランプを搭載し、励起波長範囲は200～800 nm、蛍光波長範囲は250～980 nmに設定可能である²²。検出部にはモノクロメーター方式を採用し、分光素子によって分光された光を光電子増倍管により検出する構造となっている。

2.2.2.で調整したサンプルから2 mlを採取し、石英ガラスセルに注入した後、蛍光分光光度計の試料室内のサンプルホルダーにセットして、上述の条件下で測定を行った（写真2-4）。例として濁度0.25の*S. aureus*のEEMを図2-3に示す。

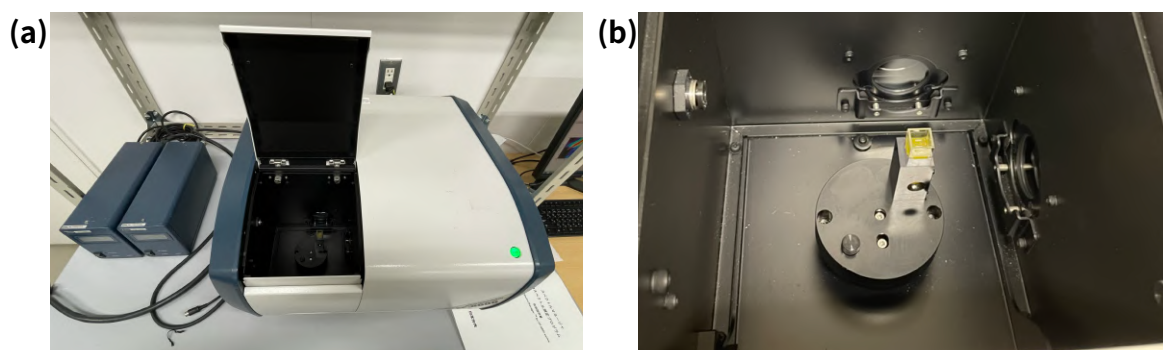


写真2-4 使用した蛍光分光光度計

- (a) 蛍光分光光度計の全体像
- (b) 試料室内部

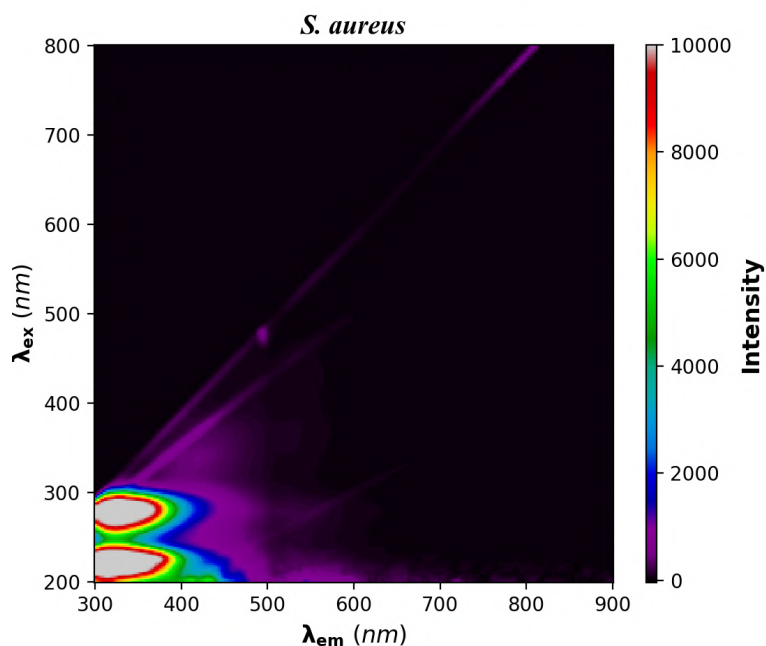


図2-3 計測によって得られた励起蛍光マトリックスのグラフ

濁度0.25の*S. aureus*の励起蛍光マトリックスのプロット。縦軸は励起波長、横軸は蛍光波長を示す。信号強度に対して擬似的に色付けを行っている。

全サンプルを用いた本計測の前に、本実験系における蛍光分光光度計の最適かつ効率的なスループットを実現するための設定値を確立するために、励起波長、蛍光波長、計測波長ステップ、計測における励起光と蛍光のバンド（物理スリット）幅、測定積分時間、積算回数、光電子増倍管の印加電圧、励起光カットフィルターや高事項カットフィルターの使用の有無を調整しながらいくつかの試行を行った。目的とする菌体構成分子による蛍光シグナル以外の、蛍光分光光度計の構造に起因するノイズや装置固有のノイズなど（図2-4）を可能な限り除外できること、サンプルごとに分散した濃度に対して目的の信号群を十分に計測できかつ飽和しない適切なダイナミックレンジ群となること、高スループットで効率的なサンプル計測時間となることを目指した適切な設定値を探索した。

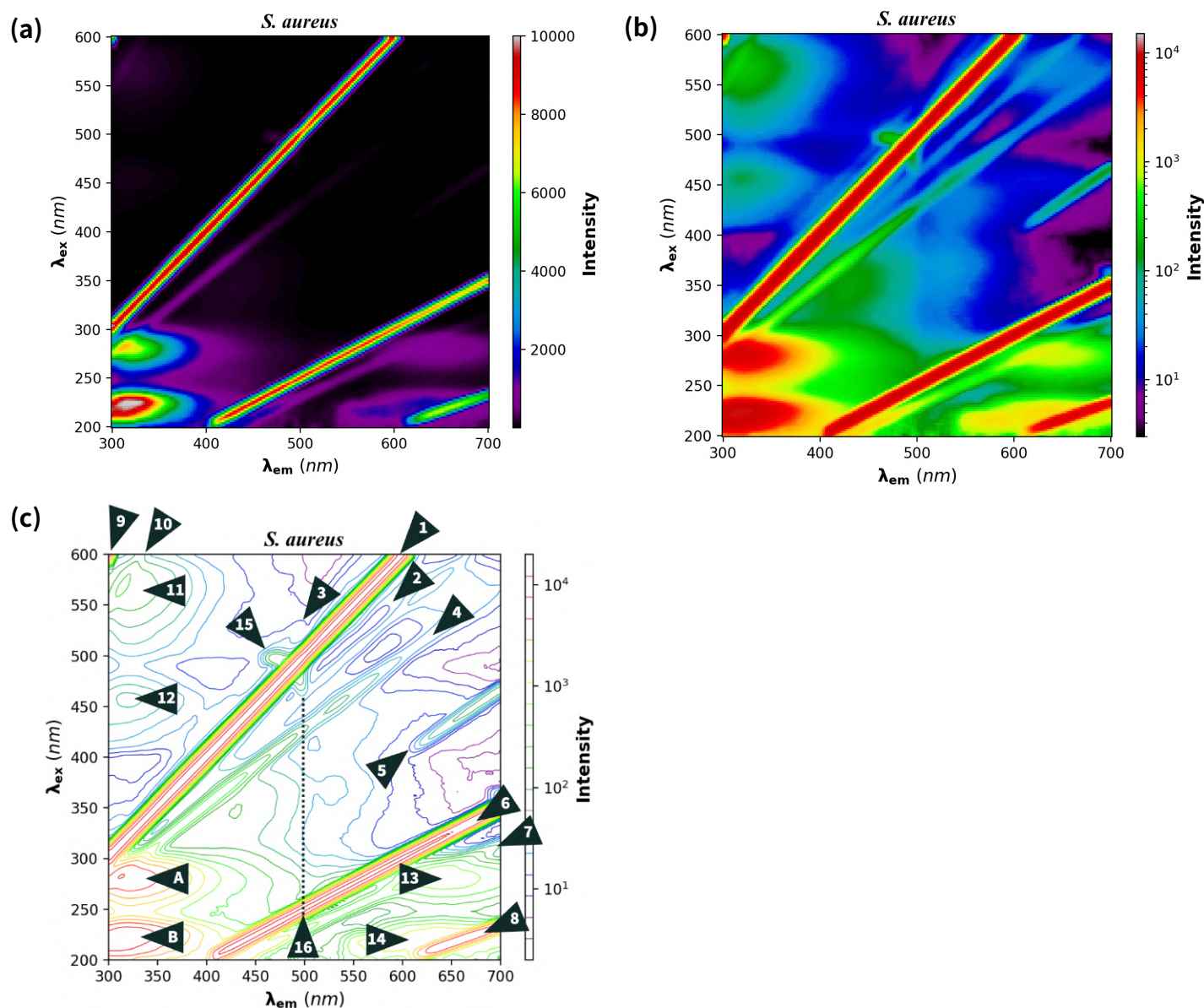


図2-4 ハードウェアに起因するノイズ

濁度0.1の*S. aureus*の励起蛍光マトリクス。

- (a) Raw data。
- (b) 暗部を可視化するためにaを対数表示したもの。
- (c) bを等高線表示したもの。

A、B：サンプルに含まれるアミノ酸由来の蛍光ピーク、1：励起光によるレイリー散乱、2：励起光によるブルリアン散乱、3：励起光によるブルリアン散乱（アンチストークス側）、4：水分子のOH伸縮振動（ 3400 cm^{-1} ）によるラマン散乱、5：1の高次回折光の分光器内での反射によるもの、6：1の二次回折光、7：4の二次回折光、8：1の三次回折光、9：1の零次回折光、10：4の零次回折光、11：二光子励起によるAの蛍光、12：二光子励起によるBの蛍光、13：Aの二次回折光、14：Bの二次回折光、15、16：使用した装置特性によるもの

試行の結果を踏まえ、最終的に計測データのダイナミックレンジ、シグナルノイズ比、スループットを全て両立させるための本実験系における蛍光分光光度計の設定を、励起波長は200～600 nm、励起波長ステップ幅2 nm、励起バンド幅5 nm、計測する蛍光波長は250～700 nm、計測波長ステップ幅を2 nm、計測バンド幅5 nmとした。また励起光の散乱や分光素子による迷光を抑制する目的で+30 nmのオフセットを付けた励起光カットフィルターおよび高次光カットフィルターを使用する設定とした。例として濁度0.25の*S.aureus*のEEMを図2-5に示す。この設定値で全サンプルの自家蛍光を計測した。

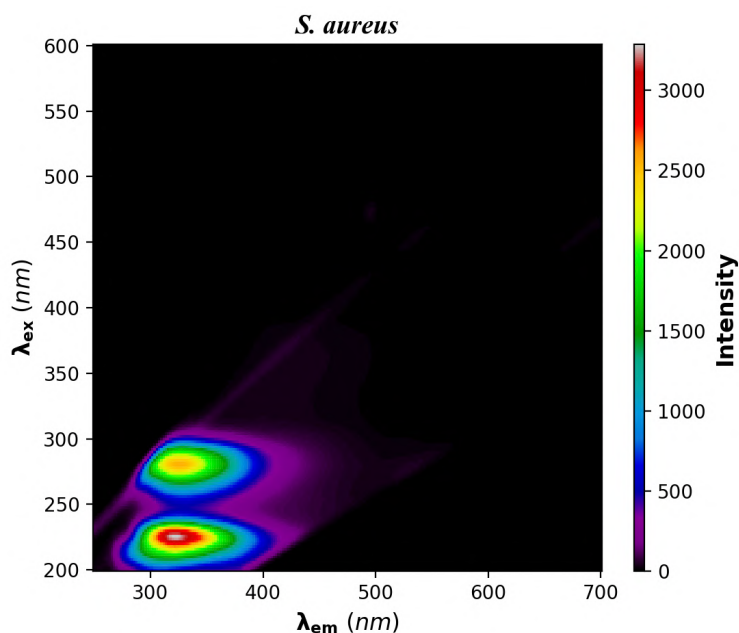


図2-5 最終的な設定値によって得られた励起蛍光マトリクス

施行後に最終的に決定した設定値で計測した場合の濁度0.25の*S. aureus*の励起蛍光マトリクスのプロット。

励起波長は200～600 nm、励起波長ステップ幅2 nm、励起バンド幅5 nm、計測する蛍光波長は250～700 nm、計測波長ステップ幅を2 nm、計測バンド幅5 nm、1回の測定は10 ms、積算回数は1回、光電子増倍管の印加電圧はMedium (400 V) に設定した。

2.3.2. データ収集、前処理

取得した励起蛍光スペクトルデータを、csvファイル形式で出力し計算機 (Macbook Air / Mac OS 14.6.1、Apple、米国) 上で処理した。データ処理、可視化、解析にはPython (ver. 3.11.9) を、スクリプトの実行およびライブラリの管理に仮想環境 (venv) を使用し、解析環境の一貫性を確保してパッケージ依存関係を管理した (全ての依存パッケージおよびバージョン情報は補遺8.2を参照)。Pythonを用いて出力csvファイル内に記録された信号値のデータマトリクスに対して励起波長、蛍光波長、菌種、濁度をラベル付けしデータセットを作成した。

EEMに内包される菌種毎のパターンを可視化するための前処理として、データマトリクスに対してバイキュービック補完による平滑化、対数化を行った。

2.3.3. 細菌自家蛍光の全体的な傾向

各菌株サンプルのEEMを計測した結果、全サンプルに共通する明らかなピークが複数確認された（図2-6）。まずEEM上では220および280 nmの紫外線によって励起される330 nm付近の紫外領域の強い蛍光ピークが2つあり（図2-6cのA、B）、それぞれのピークはEEM上で蛍光軸方向に延伸するような楕円の形状、すなわち蛍光波長よりも励起波長に特異的であることがわかった。また信号値を対数変換して2つの大ピーク以外的小ピークについて検討したところ、340 nmの紫外線によって励起される440 nm付近の弱い蛍光ピーク（図2-6cのC）、260 nm、360 nm、430 nmで励起される530 nm付近の弱い蛍光ピーク（図2-6cのD、E、F）、そして570 nmで励起される650 nm付近の弱い蛍光ピーク（図2-6cのG）が存在していることがわかった。今回の実験対象とした全ての菌種において、これら2つの大ピークと5つの小ピークが共通して存在していることが示された。

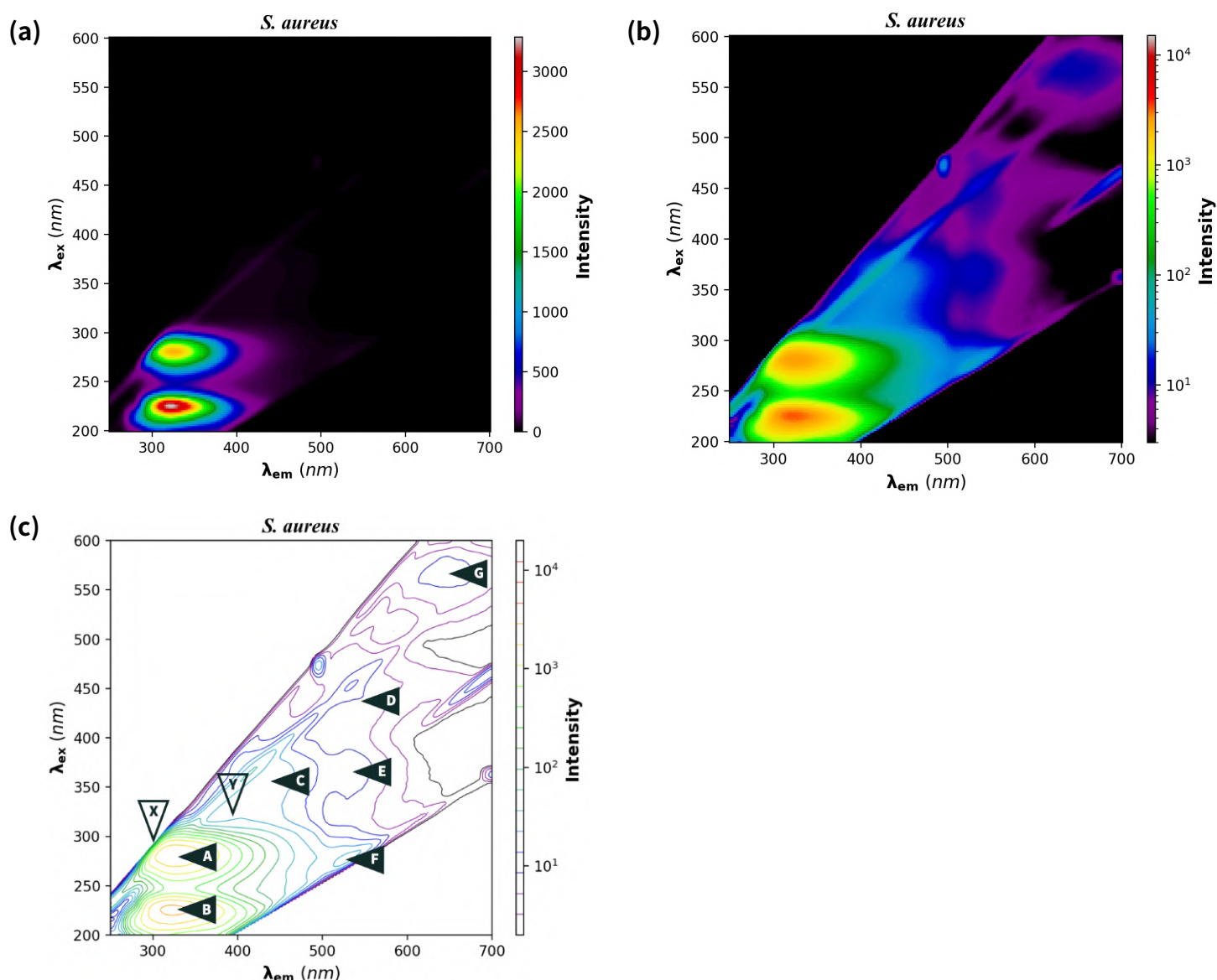


図2-6 細菌自家蛍光の全体的な蛍光、および各ピークに対応する分子について

(a) 未処理の励起蛍光マトリクス。

(b) aを対数表示したもの。

(c) bを等高線表示したもの。図中三角で示す番号毎のピークは下記の分子によるものと考えられる。A、B：TryptophanおよびTyrosine、C：NADH、D、E、F：Riboflavin、G：

これらの蛍光ピークを既存の有機物の光学的特性や細菌の自家蛍光に関する研究と照らし合わせた結果、今回の計測において観察された各ピークは、細菌の構成成分に起因するものであると考えられた。具体的には、図2-5のピークAおよびBはTryptophanおよびTyrosine²³、ピークCはNicotinamide adenine dinucleotide (NADH)²⁴、ピークD、E、FはRiboflavin²⁵、そしてピークGはProtoporphyrinに対応する²⁶と推測された。また菌体構成成分の中でも比較的強い蛍光を発するものとして、Phenylalanine (図2-6のX)²²、およびPyridoxine (図2-6のY)²⁵が本サンプル中においても存在しているはずであるがEEM上では直接的に確認が困難であった。これはTryptophanやTyrosineの強い蛍光ピーク、およびRayleigh散乱や水のRaman散乱に近接していることから他のピークに重畳されている可能性がある。さらに、これらのピークの強度はサンプルの濁度に強く影響されることが確認され、すべての菌株のEEMにおいて濁度と信号強度には線形の比例関係が観察された (図2-7)。

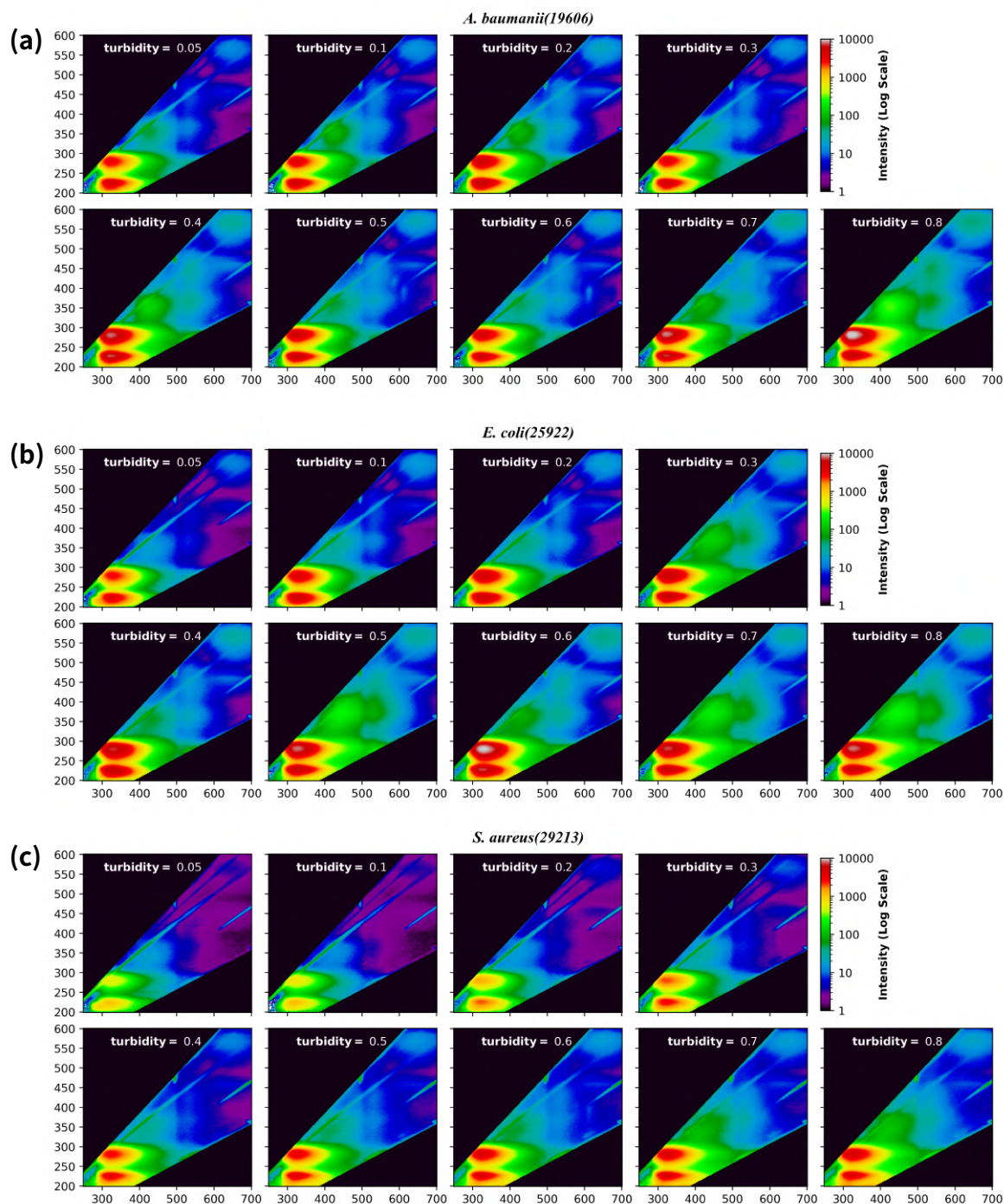


図2-7 濃度による各ピークの強度の変化

菌株毎の各濁度での励起蛍光マトリクスを対数表示し、濁度毎に並べたもの。

(a) *A. baumannii*、 (b) *E. coli*、 (c) *S. aureus*

2.4. 自家蛍光の菌種間の差異

本節では2.3.で述べたEEMの全体的な特徴を踏まえた上で、さらに各細菌株間における自家蛍光の差異を詳細に解析し、菌種特異的な蛍光パターンの特徴について検討する。まず菌株ごとのEEMを2次元のパターンとして比較することで、各菌種固有の蛍光応答の違いを視覚的に捉える。次に個別の波長ごとの蛍光スペクトルを比較し、特定の波長域における蛍光強度の差異を評価する。さらに得られた蛍光データに対して統計学的解析を適用し、菌種間の有意な差異をより顕在化するためのプロセスについて論じる。

2.4.1. 菌株ごとのEEMの比較

実験によって得られた様々な濁度の菌株の信号値を平均化した、各菌株の平均的な励起蛍光マトリクスを図2-8に示す。

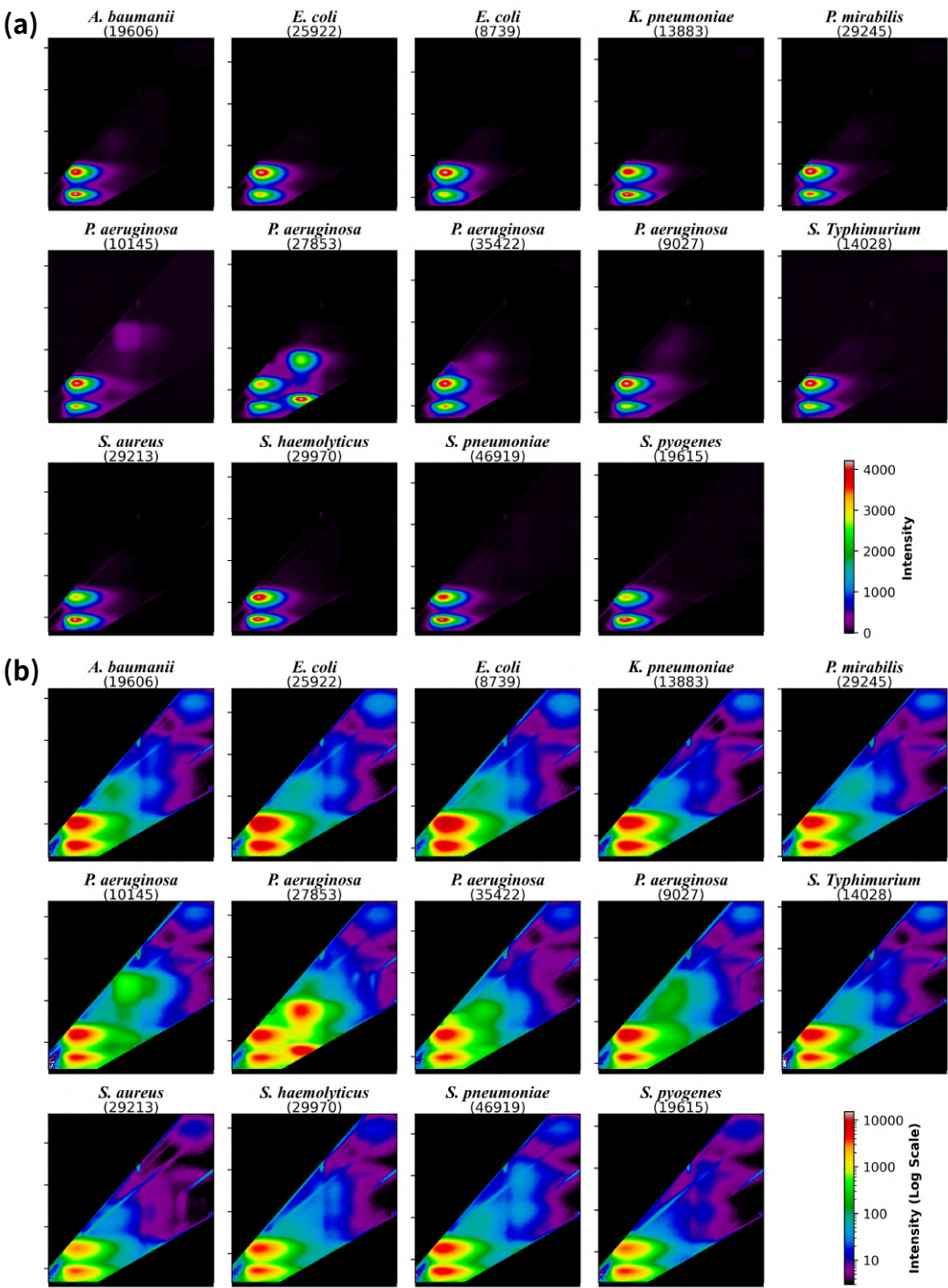


図2-8 各菌株の平均的な励起蛍光マトリクス

各菌株の励起蛍光マトリクスのサンプル間の平均値のプロット。

- (a) Raw data.
- (b) aを対数表示したもの。

*P. aeruginosa*では、250 nmおよび350 nmで励起される430 nmの2つの蛍光ピークが他菌株よりも相対的に強く、特にATCC 27853株では他の菌種には見られない240 nmおよび360 nmで励起される440 nmの蛍光ピークが観察された。これらのピークは過去にも同様のピークが報告されている²⁷ことから*P. aeruginosa*特有の蛍光物質であるPyocyaninやPyoverdine、Pyrorubinに直接的に由来するものと考えられる。しかしこれらのピークは2.3.4で述べたNADHのピークとも近接しており、単一の分子によって生じているものではなく、構成分子が発する蛍光の総和によって形成されたパターンである可能性もある。また*P. aeruginosa*以外の菌種については、EEM上で明確な菌種特異的のピークは認められず、むしろ濁度の変化に伴う信号強度の変動が視覚的な差異として顕著に観察された。

菌種同定に自家蛍光によるEEMパターンを用いた研究はいくつか報告されており^{28, 29}、一見菌株毎に特徴的なパターンが示されているように見えるが、実験系におけるサンプルの菌濃度について記述されていないものが多く、濃度による信号値の変化と菌株の持つ本来のシグナルパターンとの差異を厳密に分離できていないものが存在している可能性がある（図2-9）。

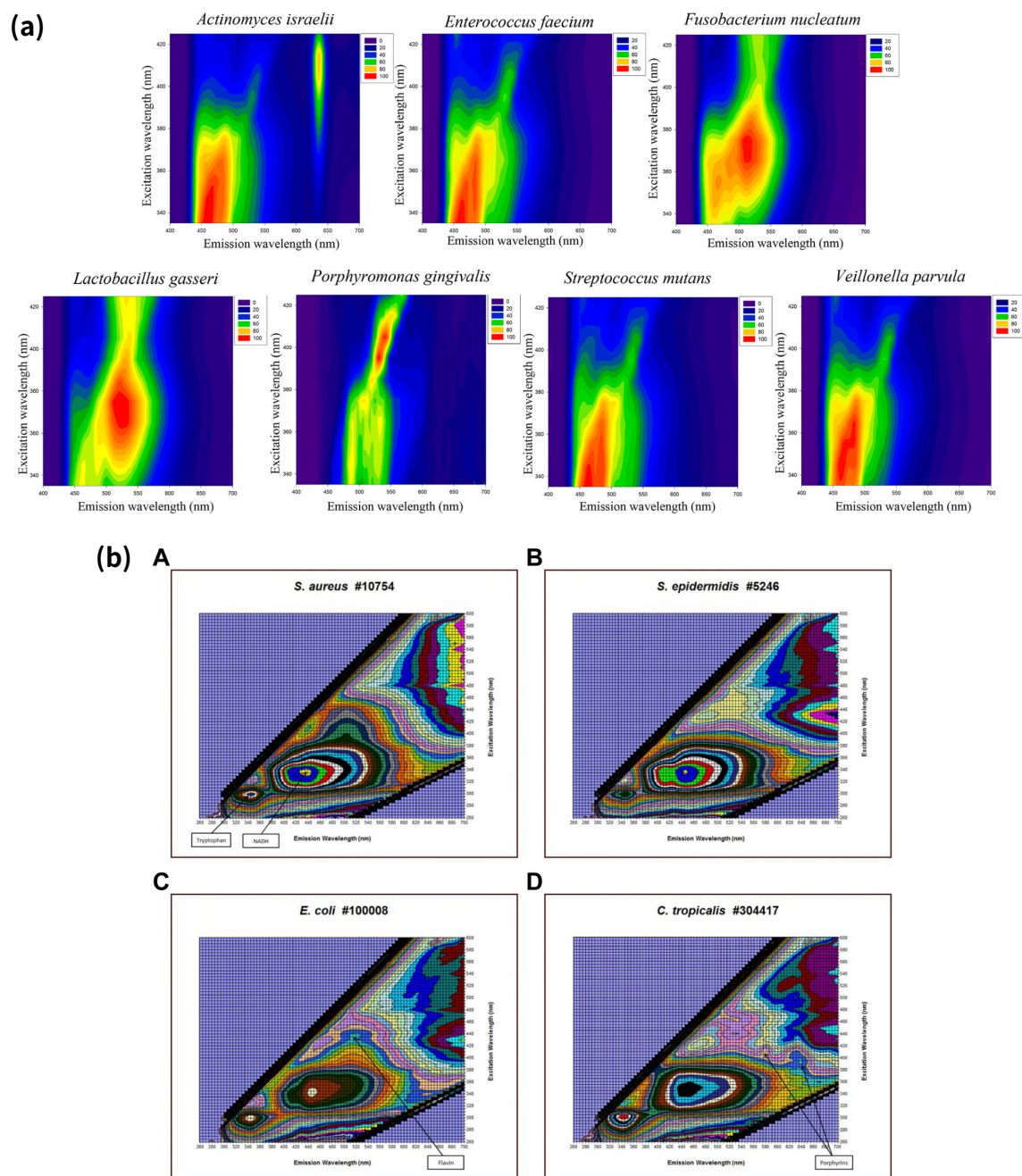


図2-9 過去の類似研究における菌株毎のEEMの比較（文献27、28より引用）

(a) Excitation-emission matrices (EEMs) of the complete fluorescence response exhibited by each oral bacteria²⁷

(b) Examples of microbial excitation-emission matrices²⁸

これらの結果から、限られた菌株（今回の実験系においては*P. aeruginosa*のみ）に対してはEEMを基に菌種が類推できる可能性が示唆されたが、多くの菌株においてはEEM全体を2次元パターンとして解析し、視覚的な蛍光ピークの位置の差異をもって菌種同定する手法は困難であると考えられた。

2.4.2. EEMから抽出した個別の励起波長の蛍光スペクトルによる比較

次に2次元パターンではなく、1次元パターンによる比較を試みた。励起蛍光マトリクスから任意の蛍光スペクトルを抽出し、サンプルごとの平均値を取って通常の分光法と同じように比較した場合のプロットを図2-10に示す。同一菌種の蛍光スペクトルを濁度毎に比較した場合、2.3.4.でEEM上で確認されたのと同様に、濁度によってピークの信号強度に強弱があること、中等度の濁度までは濁度と信号強度が比例するが一定値以上では逆に減衰することがわかった（図2-10c）。さらに、信号強度の増加に伴い、蛍光波長のピークが僅かに長波長側にシフトする現象も観察された（図2-10cの黄点線）。

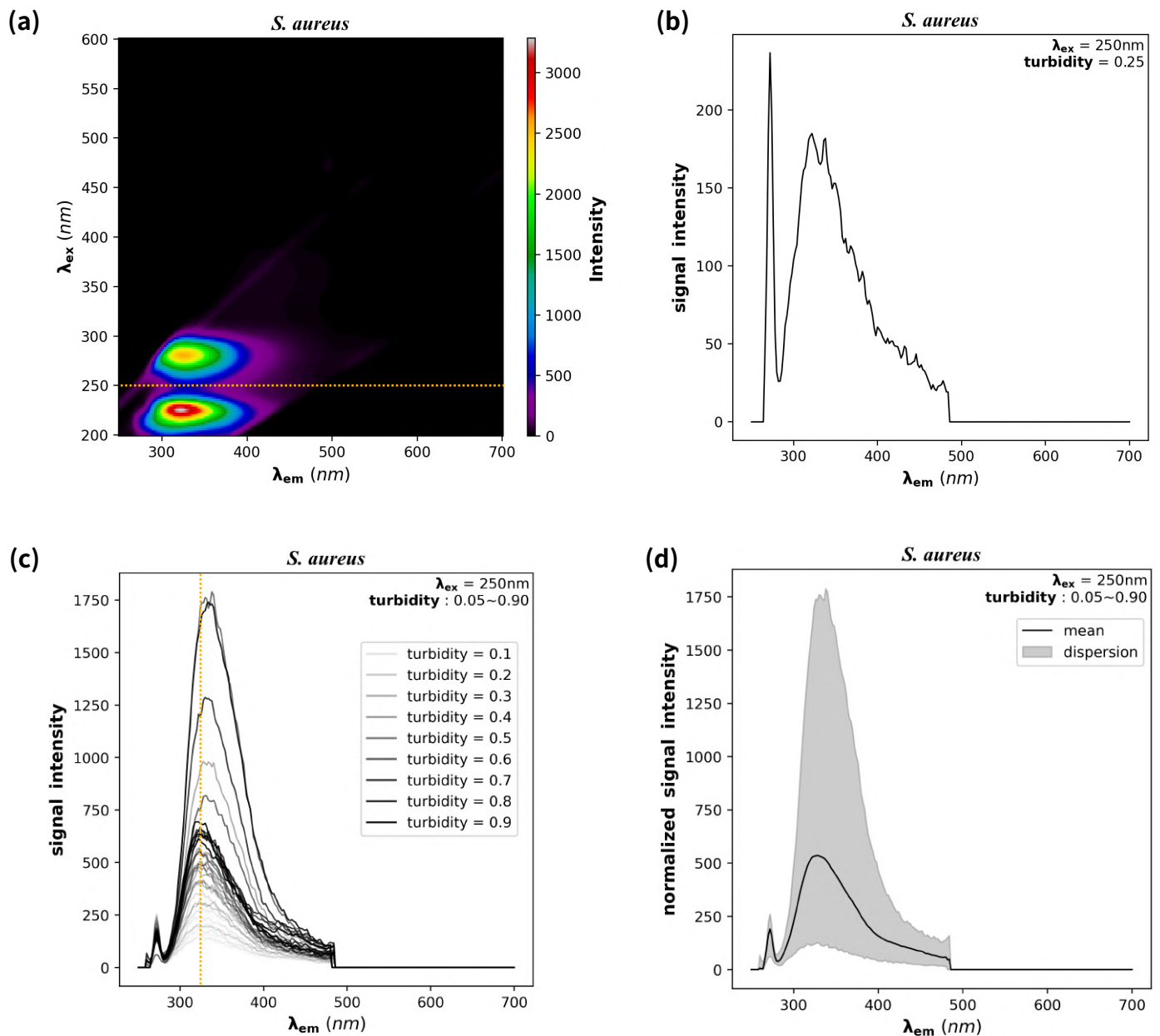


図2-10 励起蛍光マトリクスから抽出した1蛍光スペクトルの、サンプル間の平均値と分布

*S. aureus*のサンプル間の平均値と分布のプロット。

(a) 濁度0.25の*S. aureus*の励起蛍光マトリクス。黄点線は抽出する励起波長250 nmに対する蛍光スペクトルの位置を示す。

(b) aの黄点線上で切り出した、濁度0.25の*S. aureus*の励起波長250 nmに対する蛍光スペクトル。プロットの短波長側はレイリー散乱によるノイズを除去するための励起光カットフィルターによって、またプロットの長波長側は回折格子の2次光以上をカットする高次光カットフィルターによって信号強度が0となっている。

(c) 濁度0.05から0.90までの*S. aureus*の全サンプルの、励起波長250 nmに対する蛍光スペクトルを重ねて表示したもの。黄点線は低濁度時の蛍光ピークを中心波長である320 nmの位置を示す。

(d) cのサンプル間の信号強度の分布範囲とその平均値。

また、これを菌種ごとに比較した場合、蛍光スペクトルは励起波長および蛍光波長に応じて菌種間で異なるピーク波長とその強度分布を示すことが確認できた（図2-11）。さらに一部の菌株においては特異的なスペクトル波形が複数確認された。例えば励起波長250 nmでは*P. aeruginosa*（ATCC 27853）株は他の株では認めない450 nmの強い蛍光を示し（図2-11a）、励起波長350 nmにおいてはほぼ全ての菌株が440 nmの蛍光ピークを示すものの、さらに*P. mirabilis*株と*P. aeruginosa*（ATCC 10145）株ではそのピークが20 nmほど長波長側にシフトしている（図2-11c）。また励起波長400 nmでは*P. mirabilis*株と*P. aeruginosa*（ATCC 10145、27853、9027）株で460 nmの蛍光ピークの波長幅が広く観察され（図2-11d）、さらに励起波長400 nm以上では存在する複数の蛍光ピークの強度比が菌株間で異なることがわかった（図2-11d-f）。以上より、これらの各菌株は特定の波長帯において菌株判別の材料となるような固有の蛍光スペクトル特性を複数の波長にわたって示す可能性があることを確認できた。

Mean fluorescence spectrum of each λ_{ex}

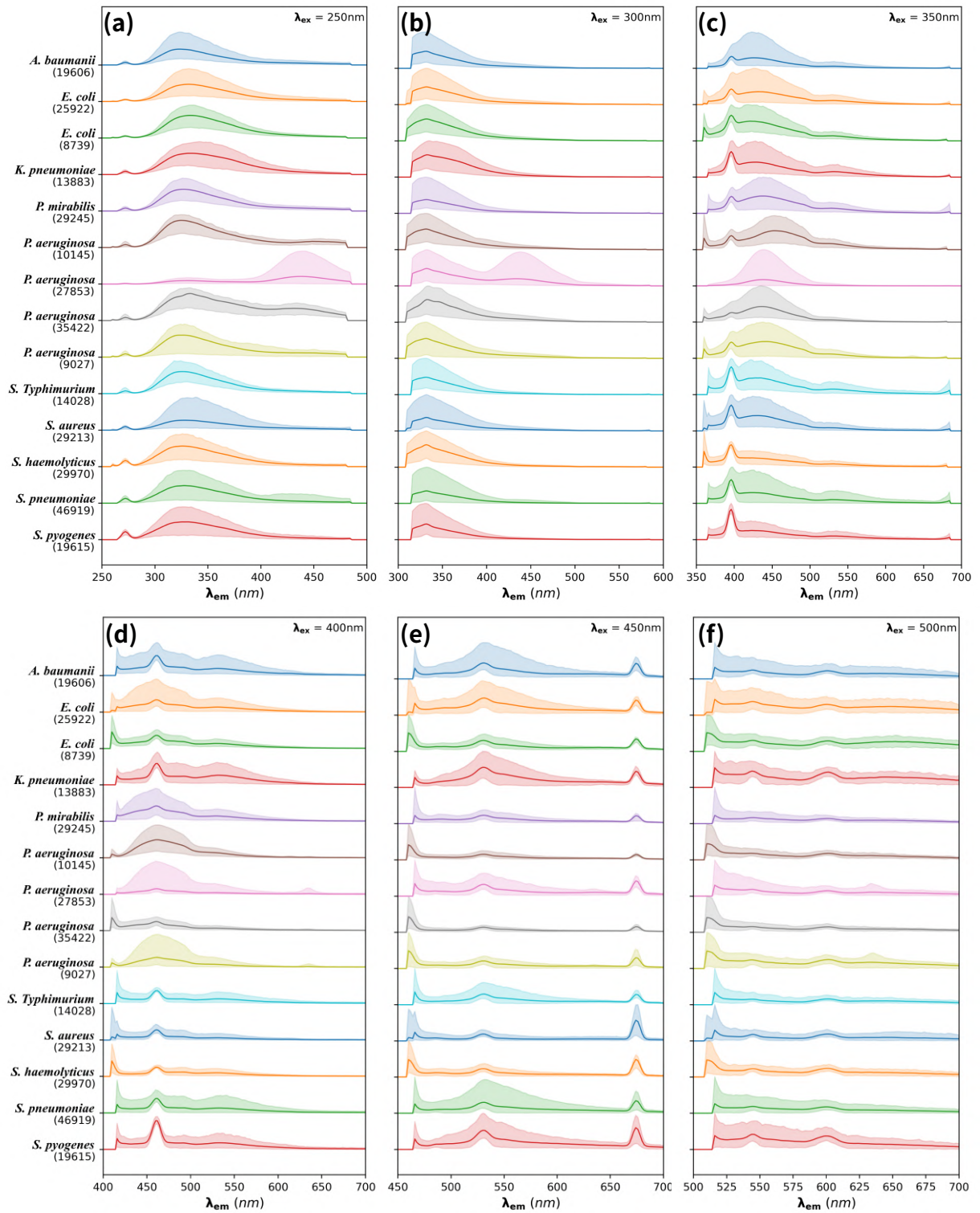


図2-11 各菌株の蛍光スペクトルの平均値と分布

1つの菌株について縦軸に信号強度、横軸に蛍光波長をプロットしたものを、各菌株ごとに縦に並べたもの。各励起波長毎に信号強度を正規化している。

(a) 励起波長250 nmの場合、 (b) 励起波長300 nmの場合、 (c) 励起波長350 nmの場合、
(d) 励起波長400 nmの場合、 (e) 励起波長450 nmの場合、 (f) 励起波長500 nmの場合。

また励起波長ごとに観察される蛍光スペクトルの差異は、それぞれの励起波長で離散的に生じるものではなく、近接する励起波長では類似した結果が得られることも確認された(図2-12a)。このため、ある菌株サンプルの任意の励起波長における蛍光スペクトルを取得する際、近接する波長を代用できる可能性がある。また、近接する波長の蛍光スペクトルを統合することで、そのスペクトルに含まれる菌株の特徴を(同一励起波長での単純な積算よりも)効果的に抽出できる可能性がある。

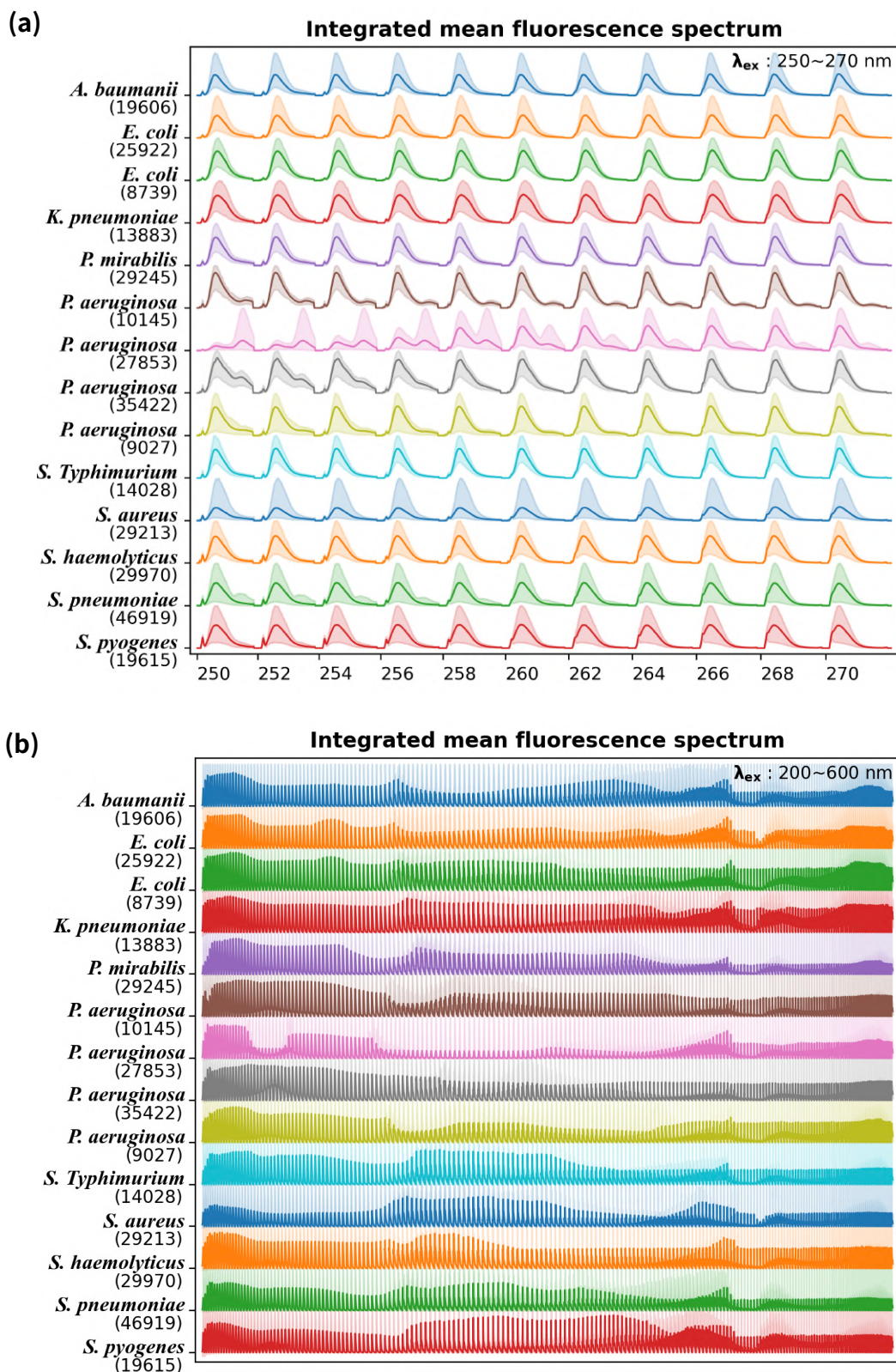


図2-12 各菌株の蛍光スペクトルの平均値と分布

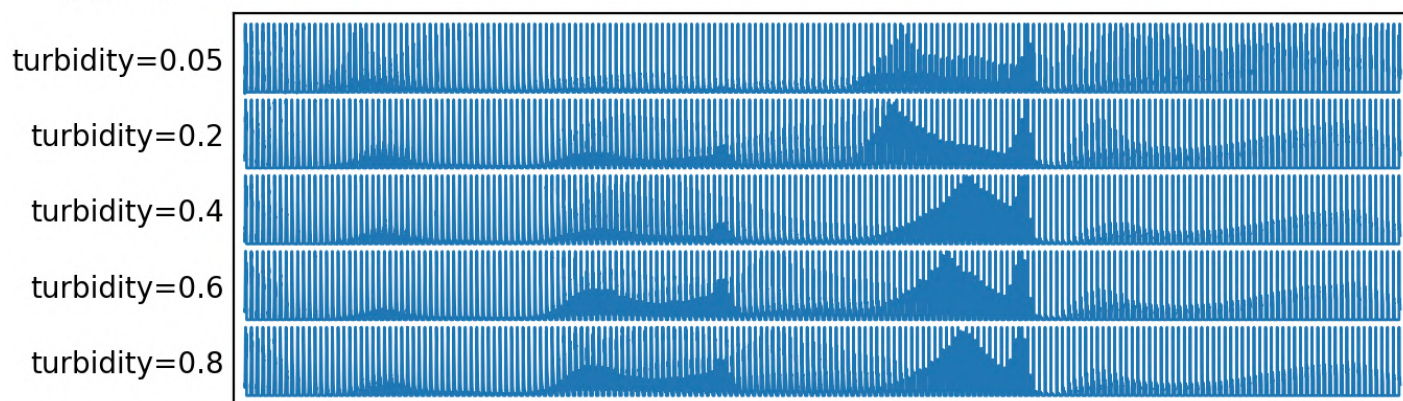
図2-11のプロットを励起波長順に並べたもの。

(a) 励起波長250から270 nmまでを並べたもの。

(b) 全励起波長(200から600 nmまで)を並べたもの。

一方で、このようにして得られた各菌株のピーク信号強度の励起波長ごとの分布は、2次元マトリクスから1次元マトリクスに変換した結果得られたものである。これらの菌株ごとの平均値から得られる1次元マトリクスは、一見すると菌株特異的であるように見えるが（図2-11b）、これはあくまで平均であり、個別のサンプルでは濁度の違いによって全体的なスペクトルパターンが大きく変化するため（図2-13）、2.4.1の結論と同様に、これらのスペクトルパターンを視覚的に評価して菌種を同定する手法には限界があると考えられた。

(a) *S. aureus*



(b) *A. baumannii*

(19606)
turbidity=0.2

E. coli

(8739)
turbidity=0.2

P. aeruginosa
(10145)
turbidity=0.2

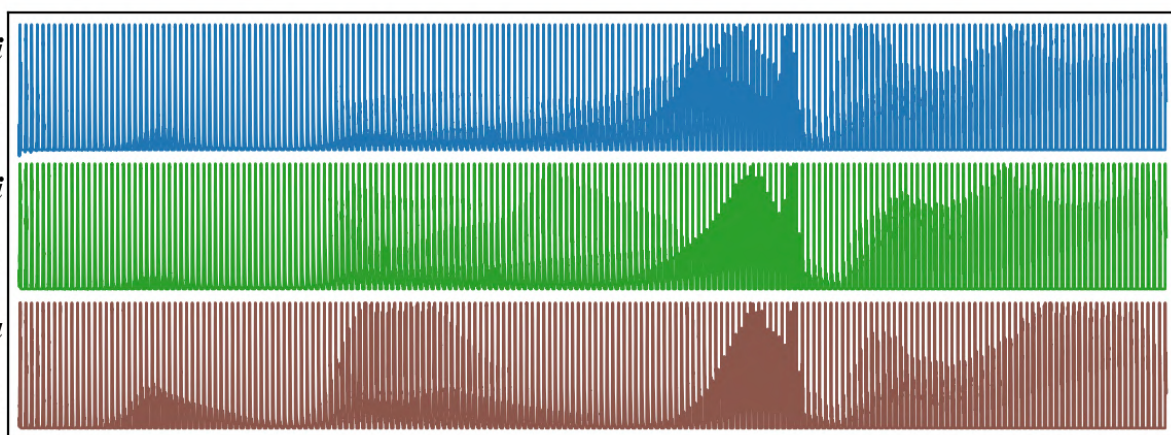


図2-13 各サンプルの蛍光スペクトルの1次元配列

菌株ごとの平均値ではなく、1サンプルの全励起波長の蛍光スペクトルを1次元配列したもの。

(a) *S. aureus*の濁度毎の比較。

(b) 濁度0.2のサンプルの菌株毎の比較。

2.4.3. 統計学的な解析を用いた比較

2.4.2.の結果から、蛍光スペクトルには菌株ごとの微細な差異が含まれている可能性が示唆された。特に、励起波長によってこれらの差異が顕著に現れる菌株もあれば、そうでない菌株も存在することが確認された。これらの差異を複数の励起波長にわたって組み合わせることで菌株の同定が可能になる可能性があるが、視覚的にこれらのパターンを評価することは容易ではない。また、これらのデータは大部分が菌株ごとに共通した要素から成り、ごく一部に小さな差異が含まれていることが明らかとなった。

次の段階として、これらのスペクトルデータにおける差異を最大化し、データ分布に対する最適な座標軸を算出するため、主成分分析（principal component analysis: PCA）を適用した次元削減を行った。異なる次元空間にデータをプロットし、菌種同定が可能かどうかを検討した（図2-14）。PCAの結果について、まず1次元PCAプロットではすべての菌株を1軸上に分布させたが、色毎のクラスタリング（すなわち同色同士のグループによる他グループとの明確な位置的な分離）による菌株間の分離は全く達成されなかった（図2-14a）。当然であるが1次元の情報だけでは菌株の区別が困難であることを示している。次に2次元PCAプロットでは、1次元プロットよりも各サンプルは分散した分布を示しているものの、菌株ごとのクラスタリングは観察されなかった。さらに一部の菌株が他の菌株と重なり合っている様子が見られ、濁度の違いがプロット位置に影響を及ぼしている可能性が示唆された（図2-14b）。このことから、菌株ごとに特有の分布パターンは見られるものの、濁度の変動が識別を困難にしている要因であると考えられる。3次元PCAプロットでは、2次元プロットに比べプロットの分布がさらに広がり、菌株間の分離が一部向上しているように見える（図2-14c）。観察角度によっては、一部の菌株において濁度ごとにクラスタリングしている箇所もあるが、全体的には多くのプロットが依然として混在している。この結果から、次元を増やすことで分布の広がりが得られるものの、濁度の影響や菌株間の類似性により、完全な分離は依然として難しいことがわかった。

これらの主成分分析に基づく3次元可視化結果から、より高次元の分析を行うことで菌株間の識別精度が向上する可能性が示唆された。蛍光スペクトルデータにおいて、高次元の成分が菌株の同定に重要な役割を果たしていると考えられる。また、同一菌株であっても濁度の違いによってプロット位置が大きく変動することから、菌株の違いと同程度に濁度がPCAの結果に影響を与えていることが明らかになった。実験室環境ではサンプルの濁度を調整可能であるが、臨床現場においては濁度の厳密な調整が困難であるため、菌株を同定する過程において濁度の影響を排除することは難しい。このため、濁度の変動を考慮しつつ菌株を同定する手法についての検討が必要である。一方で、PCAプロットは異なる菌株の自家蛍光特性を視覚化するための有効な手段であり、より高次元の主成分分析を適用することで菌種の同定が可能になる可能性も示唆された。次章では、これらの高次元データを基に機械学習を用いた手法を導入し、菌株の識別精度向上を目指した解析結果について詳述する。

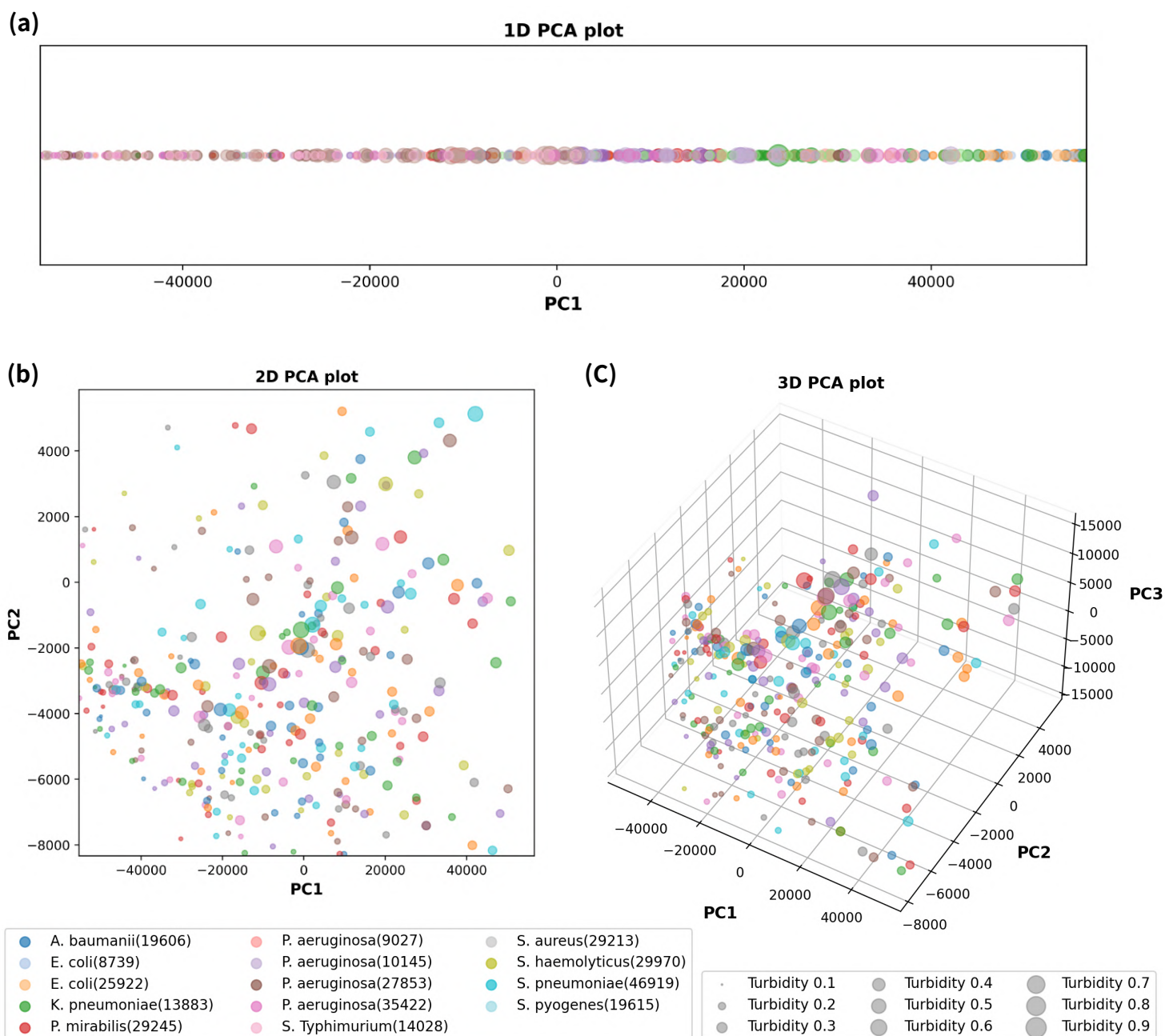


図2-14 主成分分析結果の、各次元空間上でのプロット

主成分分析した蛍光スペクトルの、1、2、3次元空間上におけるプロット。プロットの色は菌株を、プロットの大きさは濁度を表す（aからcのグラフで大きさと濁度関係が同一となるようにグラフサイズを調整している）

(a) 主成分の第1軸のみを用いて1次元空間上にプロット。

(b) 主成分第1、2軸を用いて2次元空間上にプロット。

(c) 主成分第1、2、3軸を用いて3次元空間上にプロット。

2.5. まとめ

本研究では、細菌の自家蛍光を利用した菌種同定のため、EEM（励起-蛍光マトリクス）を測定する実験系を構築し自家蛍光の計測を行った。しかしこうして得られたEEMデータを視覚的に弁別しようとしたものの、肉眼での識別や次元削減による視覚的クラスタリングにおいて、各菌株を明瞭に分離することは困難であった。特に、次元削減法の一つである主成分分析（PCA）を用いることで、濁度の影響により同一菌株内のサンプル間でも分布位置が変動し、菌種ごとのクラスタリングが困難であることが示された。このことは、濁度が菌種同定におけるノイズとして働く可能性が高いことを示唆しており、視覚的な弁別法や次元削減法だけでは、菌種の確実な識別が難しいという限界が浮き彫りになった。一方で、得られたEEMデータには視覚的に認識可能な明らかなパターンの差異以外にも、肉眼では識別できない微細なパターンや隠れた相関が潜在している可能性がある。これをより高精度に解析するためには、機械学習などの統計的手法を導入し、自動分類の精度を向上させる必要があると考えられた。次章では、この膨大な蛍光スペクトルデータに対し、機械学習を用いた解析手法を適用することで、視覚的手法では識別が困難であった菌種の特異的な蛍光特性を抽出し、分類精度の向上を目指す。

-
- ¹ Silverstein RL, Webster FM, Kiemle DS, Bryce DB. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8th ed. New York, NY: John Wiley & Sons; 2016.
 - ² *Mass Spectrometry: A Textbook*. 3rd edition. Springer Berlin Heidelberg; 2017.
 - ³ Claridge TDW. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 4th ed. Wiley; 2009.
 - ⁴ Perkampus, H. H. (Ed.). (1992). *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Springer Science & Business Media.
 - ⁵ Fessler JA, Sahl SG, Mottie JR, eds. *Handbook of Vibrational Spectroscopy: Infrared, Raman and Near-Infrared*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2003.
 - ⁶ Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 63-95). Springer.
 - ⁷ Billinton, N., & Knight, A. W. (2001). Seeing the wood through the trees: A review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry*, 291(2), 175-197.
 - ⁸ Chance, B., & Thorell, B. (1959). Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry. *Journal of Biological Chemistry*, 234(11), 3044-3050.
 - ⁹ Laflamme C, Verreault D, Lavigne S, Trudel L, Ho J, Duchaine C. Autofluorescence as a viability marker for detection of bacterial spores. *Front Biosci*. 2005 May 1;10:1647-53. doi: 10.2741/1648. PMID: 15769654.
 - ¹⁰ Hill SC, Mayo MW, Chang RK. *Fluorescence of Bacteria, Pollens, and Naturally Occurring Airborne Particles: Excitation/Emission Spectra*: Defense Technical Information Center; 2009.
 - ¹¹ Talari, A. C. S., et al. (2017). Fluorescence spectroscopy for bacterial identification and characterization: A review. *Journal of Fluorescence*, 27(2), 257-271.
 - ¹² Giana HE, Silveira L, Zângaro RA, Pacheco MTT. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis. *Journal of Fluorescence*. 2003;13(6):489-493.
 - ¹³ Liu, Y., et al. (2019). Machine learning for fluorescence spectroscopy: A review. *Journal of Biophotonics*, 12(3), e201800334.
 - ¹⁴ Shlosberg Y, Farber Y, Hasson S, Bulatov V, Schechter I. Fast label-free identification of bacteria by synchronous fluorescence of amino acids. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(27):6857-6866.

-
- ¹⁵ Ingle, J. D., & Crouch, S. R. (1988). Spectrochemical Analysis. Prentice Hall (pp. 300-320).
- ¹⁶ Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2nd ed.
- ¹⁷ Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4), 325-346.
- ¹⁸ Martínez-Felipe A, et al. Application of Fluorescence Spectroscopy in Biological Sample Analysis. *Journal of Molecular Biology*.
- ¹⁹ ATCC(Bacteriology culture guide) : <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/bacteriology-culture-guide> (2024.9.4アクセス) .
- ²⁰ ATCC(ATCC Introduction to Microbiology) : <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/introduction-to-microbiology> (2024.10.24アクセス) .
- ²¹ Heuser E, Becker K, Idelevich EA. Evaluation of an automated system for the counting of microbial colonies. Papp-Wallace KM, ed. *Microbiol Spectr*. 2023;11(4):e00673-23.
- ²² JASCO 「日本分光 製品情報」 : <https://www.jasco.co.jp/jpn/product/FP/spec.html> (2024.9.21アクセス) .
- ²³ Yang H, Xiao X, Zhao X, Wu Y. Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Design and Manufacturing Engineering*. Atlantis Press; 2015.
- ²⁴ Cannon TM, Lagarto JL, Dyer BT, et al. Characterization of NADH fluorescence properties under one-photon excitation with respect to temperature, pH, and binding to lactate dehydrogenase. *OSA Continuum*. 2021;4(5):1610.
- ²⁵ Yang H, Xiao X, Zhao XS, Hu L, Xue XF, Ye JS. Study on fluorescence spectra of thiamine and riboflavin. Kao JCM, Sung WP, eds. *MATEC Web Conf*. 2016;63:03013.
- ²⁶ Wang P, Dong F, Wang X, et al. Effects of riboflavin and AQS as electron shuttles on U(vi) reduction and precipitation by *Shewanella putrefaciens*. *RSC Adv*. 2018;8(54):30692-30700.
- ²⁷ Peguda HK, Mahbub SB, Sherpa TD, et al. The autofluorescence patterns of *acanthamoeba castellanii*, *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus*: effects of antibiotics and tetracaine. *Pathogens*. 2021;10(7):894.
- ²⁸ Kang S, de Josselin de Jong E, Higham SM, Hope CK, Kim B. Fluorescence fingerprints of oral bacteria. *Journal of Biophotonics*. 2020;13(1):e201900190.
- ²⁹ Walsh JD, Hyman JM, Borzhenskaya L, et al. Rapid intrinsic fluorescence method for direct identification of pathogens in blood cultures. Gilligan P, ed. *mBio*. 2013;4(6):e00865-13.

3. 機械学習による自家蛍光データを用いた菌種同定

前章における解析結果から、蛍光スペクトルデータには膨大な情報量と微細な強度変化が包含されており、目視による直感的解析ではピークの微細な差異を適切に評価することが本質的に困難であることが明らかとなった。EEMデータは図2-6に示すように生体分子由来の複数の蛍光ピークが重畳する複雑なスペクトルパターンを呈しているため、目視による直感的解析ではピークの微細な差異を適切に評価することが困難であった。さらに、一般的な多変量解析手法である主成分分析（PCA）を適用しても、3次元以下の主成分空間では菌種の完全な判別は達成されず、菌種固有の特徴が複数の主成分に分散して内包されているため、単純な次元削減では本質的な情報の損失が避けられないことが示唆された。これらの課題を克服するため、本章では機械学習手法を導入し、自家蛍光データを用いた菌種同定の可能性を探究する。まず、機械学習の基礎と細菌の自家蛍光データへの適用について概説した上で、データの前処理手法、適切な機械学習モデルの選択と構築を、モデルのトレーニングおよび評価方法、モデルのハイパーパラメータの最適化による診断精度の向上について検討する（3.2.4.）。また個別の励起波長とその個数が診断精度に与える影響について考察し（3.3.）、さらにその波長幅の変化が診断精度に及ぼす影響についても検討する（3.4.）。

3.1. はじめに

機械学習手法は、その多変量解析的特性により、従来の手動解析では看過されがちな微細なパターンの検出を可能とする¹。この特性は、高次元かつ複雑な蛍光スペクトルデータの解析において特に有用である。データ駆動型による最適特徴量の自動抽出が可能であり、高次元データ空間における効果的な分類境界の構築を実現する²（3.1.2.参照）。実験データに不可避免的に含まれる測定ノイズや外的干渉に対して、機械学習モデルは適切な学習過程を通じてロバスト性を獲得する³。この特性によって実計測での厳密なサンプル計測環境の要求度が下がり、データ前処理工程の簡略化が可能となり、実用的な検査システムを実現することに寄与するものと考えられる。

また迅速検査デバイスの実用化においては、リアルタイムでのデータ解析および迅速な菌種同定能が要求される。機械学習モデルは一度学習完了した後の予測処理においては一般に高速でありこの要件を満たすことが可能であると考えられる³。さらに、新規菌種や抗菌薬の導入に伴うデータ構造の変化に対して、再学習プロセスを通じた適応が可能であり、システムの長期的な有用性担保に寄与する³。

本章では、第2章で取得した実験データに対する機械学習の適用を試みる、すなわち診断精度の定量的評価を通じて、励起波長および蛍光波長と診断性能との相関を体系的に解析する。この解析により、最適な光学パラメータの同定を行い、菌種診断に最適化された装置開発のための設計要件について検討する。

3.1.1. 機械学習について

機械学習は、データに内在するパターンや規則性を自動的に学習し、未知のデータに対する予測や分類を実現する数理的な手法である⁴。実験科学の観点からは、機械学習を従来の統計的手法の発展形として捉えることができ、より複雑な非線形性を扱うことを可能とする現代的な解析ツールとしての役割を担っている⁵。

機械学習アルゴリズムを分類する方法は様々なものがあるが、その学習形態の観点に注目すると主に二つのアプローチに大別される。入力データと対応する正解ラベル（教師信号）のペアを用いて学習する教師あり学習と、正解ラベルを必要とせずデータの内部構造や潜在的なパターンの発見を目的とする教師なし学習である⁵。さらに機械学習のタスクは、目的とする出力の形式によっても分類され、主に分類タスクと回帰タスクの2つに分けられる。分類タスクは入力データを離散的なカテゴリに分類するものであり、たとえば本研究における菌種同定では、各サンプルを特定の菌種（カテゴリ）に割り当てることが目的となる。一方、回帰タスクは、連続的な値を予測することを目的とする。例えば、蛍光スペクトルの強度から濃度やその他の定量的な特性を推定する場合がこれに該当する⁵。分類タスクと回帰タスクはそれぞれ

れ異なる目的を持つが、同じアルゴリズムが両者に応用可能である場合も多い⁶。本研究では、菌種同定という明確なカテゴリ分けを目的としているため、分類タスクに焦点を当てた機械学習アルゴリズムの適用が中心となる。それぞれの分類で様々なアルゴリズムが開発されてきた歴史があり、本研究の範疇である教師あり学習の分類タスクの実装においては、決定木、ランダムフォレスト、サポートベクターマシン（SVM）、k-最近傍法などの数多くの確立されたアルゴリズムが利用可能である（表3-1）。

表3-1 機械学習アルゴリズムの分類

機械学習アルゴリズムの学習タイプによる分類とタスクによる分類、およびそれぞれの範疇に属する代表的なアルゴリズム名を示す。

学習タイプ	タスク	代表的なアルゴリズム
教師あり学習	分類	ロジスティック回帰、サポートベクターマシン、k-最近傍法、ランダムフォレスト、勾配ブースティング
	回帰	線形回帰、リッジ回帰、ラッソ回帰、サポートベクター回帰、ランダムフォレスト回帰、勾配ブースティング回帰
教師なし学習	分類	k-平均法、階層型クラスタリング、主成分分析
	回帰	(回帰分析を直接行うことは少ない)

これらの手法はそれぞれが特徴的な性質を有しており、解析対象とするデータの特性に応じた適切な選択が求められる⁷。例えば、SVMは高次元データの分類において優れた性能を示す一方で、大規模データセットに対する計算コストの増大が課題となる。また、ランダムフォレストは過学習への耐性と特徴量重要度の評価機能を備えているものの、モデルの解釈が複雑化する傾向がある⁶⁻⁸（図3-1）。

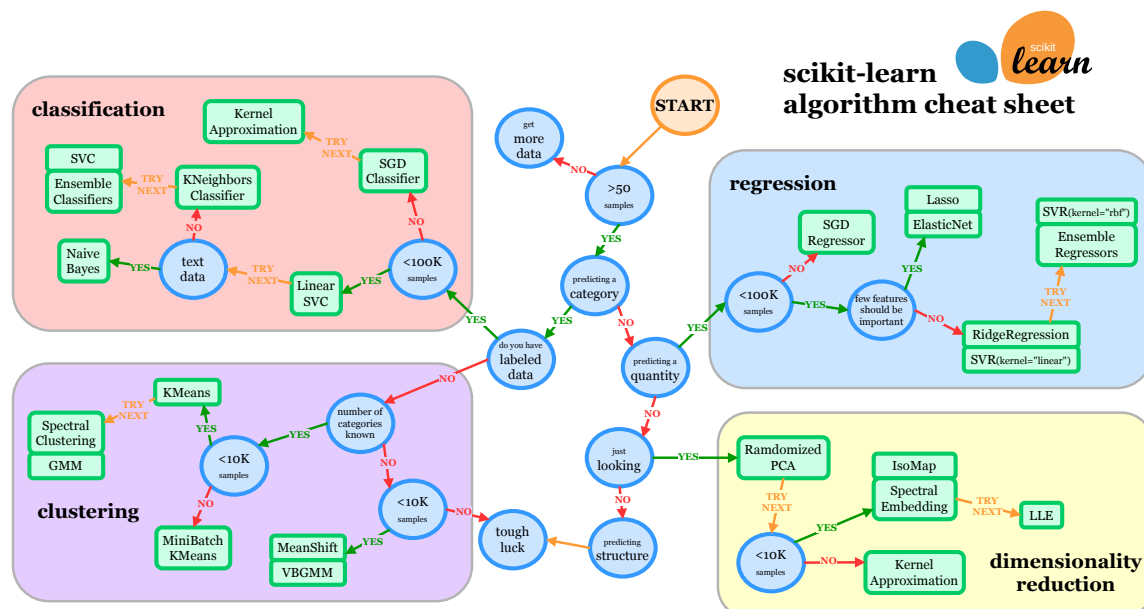


図3-1 機械学習アルゴリズム（文献7より引用）

Pythonの機械学習ライブラリの1つであるscikit-learnで提供される機械学習アルゴリズムを適切に選択するためのフローチャート。分類、回帰、クラスタリング、次元削減の4つの主要な問題タイプに分け、それぞれのアルゴリズムをデータがラベル付きかどうか、サンプル数の多さ、予測したい対象（カテゴリ、数量、構造）などの条件に基づき、最適なアルゴリズムを絞り込んでいくプロセスを視覚的に示している。

また実用的な機械学習システムの構築過程において、データの前処理工程は特に重要な位置を占める⁹。スケーリングや次元削減といった基本的な処理に加え、実験データ特有の系統的バイアスの補正など、測定系の特性を考慮した適切な前処理の実装が要求される。これらの処理は、後段の学習アルゴリズムの性能を大きく左右する要因となる⁶。

モデルの構築後においてはその性能評価と最適化が不可欠である。特に、アルゴリズム内部の設定可能な変数（ハイパーパラメーターと呼ばれる）の調整は、モデルの性能を決定づける重要な工程となる¹⁰。これらのパラメーターは、解析対象とするデータセットの特性に応じて適切に設定する必要があり、この過程はハイパーパラメーターチューニングと呼ばれる¹⁰。性能評価においては、交差検証による汎化性能の評価が標準的な手法として確立されている⁴。また今回のような学術研究における機械学習の応用では、モデルの解釈可能性が特に重要な意味を持つ。予測精度の向上のみならず、モデルが学習した特徴やパターンを科学的知見として抽出し、その妥当性を検証することが求められるが、完全にブラックボックス化しその推論根拠を追跡できないアルゴリズムも多い。この観点は将来的なプロダクトを規制当局と議論するにあたって、機械学習を用いた解析結果の信頼性担保という意味で一つの重要な要素となりうる可能性がある¹¹。

このように、機械学習による解析は、アルゴリズムの選択からデータの前処理、モデルの最適化、性能評価に至る体系的なプロセスとして構成される。各段階における適切な手法の選択と実装が、最終的な解析精度を決定づける要因となる。

3.1.2. 細菌の自家蛍光データに対する機械学習の適用について

本研究において細菌の自家蛍光データを機械学習で解析する際には、ラベル数と特徴量次元に比してサンプル数が相対的に少ないというスパースデータとしての特性が重要な課題となる¹²。菌種ごとの測定データ数を極端に増やすことができない、すなわち1つのサンプルデータを取得するのに相応の時間と労力を要する（本研究では菌株サンプルの培養と調製の1サイクルに約48時間、2.3.で示した設定値を用いた1サンプルの計測に平均して25分を要した）という主に研究環境に起因する要因である。

この特性を考慮し、本研究では従来型の機械学習手法を主として採用した。深層学習（deep learning）は多くの分野で優れた性能を示していることが多くの文献で報告されているが¹³⁻¹⁴、十分な量のトレーニングデータが得られない状況下では必ずしも最適な選択とはならない¹⁵。特に、ラベル付きデータが限られている場合、さらにデータの一貫性が完全には確保できない場合、深層学習モデルは過学習のリスクが高まることが一般に知られている¹⁶。そのため、本研究では古典的なアルゴリズムを機械学習モデルの中心に据えた。これらの手法は、比較的少ないデータ数でも有効な特徴抽出と高精度な分類が可能であり、スパースデータセットに対して優れたパフォーマンスを発揮することが既往研究でも示されている¹⁷。

機械学習モデルの構築に先立ち、スペクトルデータの適切な前処理も重要な検討事項となる。蛍光スペクトルデータは、その測定原理から複雑な波形情報を含むため、効果的な特徴抽出のための前処理が不可欠である。具体的には、信号値の標準化手法の選択や、有意な波長領域の選定などがモデルの性能に大きな影響を与える要因となる可能性がある¹⁸。

また、実用的な細菌同定システムの構築においては、計算コストの観点も重要である¹⁹。特に、迅速診断への応用を見据えた場合、モデルの予測速度は重要な要件となる。そのため、モデルの複雑性と処理速度のバランスを考慮した手法の選択が必要となる。実装時には、使用可能なメモリ容量やCPU性能などの計算資源に制約が存在することも多く、これらの制約を考慮したモデルの設計が求められる。

医療診断や食品安全への応用を見据えた場合、モデルの判断根拠の説明可能性も重要な課題となる²⁰。特に臨床現場での使用を想定する場合、単なる分類結果の提示だけでなく、その判断に至った過程や重要な特徴量の特定を求められる可能性がある。

そして実用的なシステムの構築においては、何よりも解析の再現性と信頼性の確保が重要な検討事項となる²¹。特に異なる測定条件下でのロバスト性や、新規データに対する汎化性能の担保が求められる。これらの要件に対しては、適切な交差検証手法の選択や、モデルの評価指標の設定が重要となる。

以上のように、細菌の自家蛍光データに対する機械学習の適用には、データの特性を考慮した手法の選択と、実用化に向けた様々な要件への対応が求められる。

3.1.3. ベイズ最適化について

本研究では、菌種同定モデルの性能向上を目的として、パラメーターの最適化にベイズ最適化を用いた。ベイズ最適化とは、評価に時間やコストがかかる目的関数を効率的に最適化するための確率的手法である²²。目的関数とは最適化したい対象を評価する基準であり、本研究の場合、機械学習モデルの交差検証による精度のことを指す。ベイズ最適化の基本的なアイデアは、試行回数を最小限に抑えつつ最適解を探索することであり、過去の探索結果を活用して次の試行点を効率的に選択し、総当たりの手法よりも少ない計算で最適解に到達するという特徴を持つ。

ベイズ最適化では、確率モデルの構築と獲得関数の利用という二つの主要な要素から成り立つ。まず、目的関数 $f(x)$ をガウス過程回帰という確率モデルで近似する²³。ガウス過程は、観測済みのデータ点に基づいて未知の点の値を確率分布として予測するモデルであり、この分布は平均値（すなわち最も期待される値）と分散（すなわち予測の不確実性）を含む。続いて確率モデルで得られたこれらの予測分布に基づき、次に評価すべき点を決定するために獲得関数を用いる。獲得関数は、未探索領域の調査と既知の高評価領域の深掘りのバランスを取る役割を果たす²⁰⁻²⁴。これによって未知の領域を効率的に探索しつつ、既知の有望な領域を効果的に活用することが可能となる（図3-2）。

従来の最適化手法であるグリッドサーチやランダムサーチは、パラメーター空間の次元が増加すると試行回数が指数関数的に増加し、計算資源の消費が膨大になるため、高次元かつ複雑なパラメーター空間では実用的でない場合が多かった²⁵。一方、ベイズ最適化には上記の原理によって計算効率の向上、逐次的な更新、探索と活用のバランス調整が可能という3つの利点がある。まず目的関数の評価回数を最小限に抑えながら効率的に最適解に近づくことができるため、計算資源が限られている場合や評価コストが高い場合に特に有効である²⁶。またガウス過程による予測分布は、試行済みのデータ点を反映して逐次的に更新されるため、探索が進むにつれてモデルの精度が向上する。この逐次的なアプローチにより、高次元の複雑なパラメーター空間でも効果的な探索が可能となる。さらに、獲得関数を用いることで、未知の領域を探索しつつ既知の有望な領域を活用するバランスを取ることができ、広範囲の探索と局所的な最適化を両立できる。

本研究では、各機械学習アルゴリズムのハイパーパラメーターの最適化に加え、励起光および蛍光の波長、波長幅、波長数といった光学的設定の最適化にもベイズ最適化を適用した。これにより、最適化に要する時間を大幅に短縮し、デスクトップPCとクラウドコンピューティングサービスを組み合わせられた計算リソース内で解析を実施することが可能となった。さらに、パラメーター空間の高次元性にも対応し、効率的な最適化を達成した。ガウス過程には探索が局所最適解に留まるリスクや、評価値の分布が複雑な場合に適切に機能しないという限界も存在しているが、これらに対応するため、最適化結果のみに依存せず、モデルの解釈性や汎化性能も評価した上で総合的な実験結果に基づいて最終的にモデルの最適化結果を判断した。さらにベイズ最適化とランダムサーチを適宜併用することで、探索の偏りを軽減し、ベイズ最適化の限界を補完した。

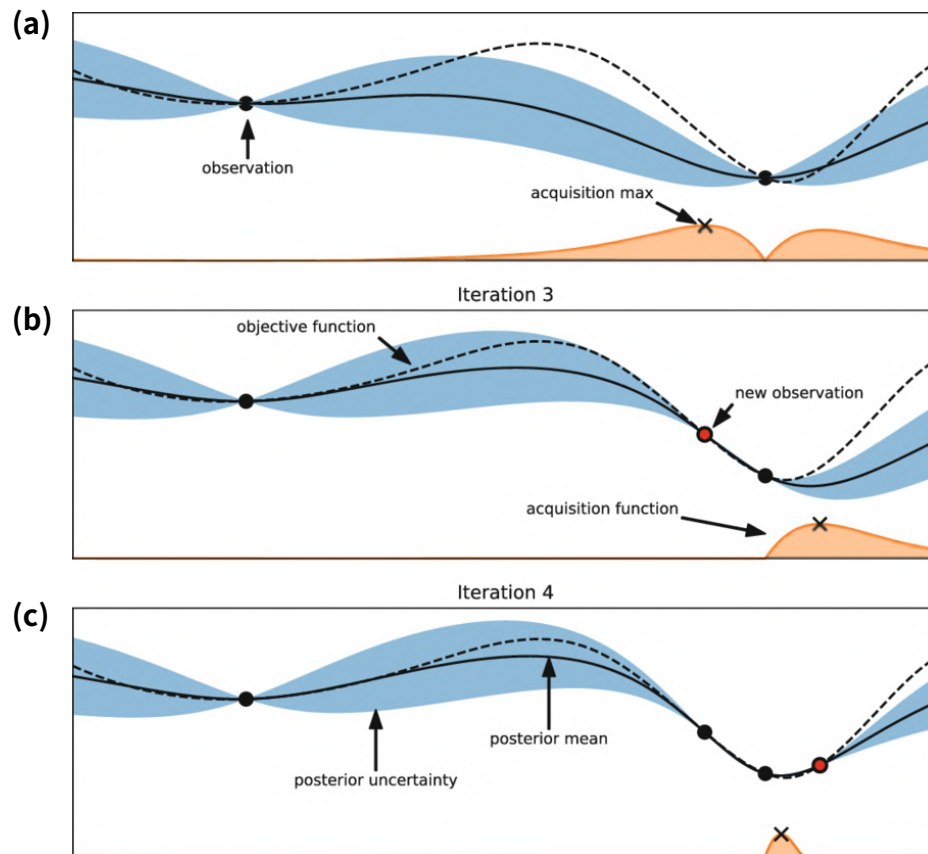


図3-2 ベイズ最適化過程のイメージ（文献20より引用）

1次元の関数に対するベイズ最適化の例を示す。未知の目的関数をガウス過程回帰で近似し、予測分布を基に獲得関数を利用して次に評価すべき点を選び最小値を求めている過程を段階に分け図示している。黒点は実測値、黒点線は未知の目的関数、黒実線はガウス過程回帰による近似関数、青領域は予測値の分散、グラフ下部の橙領域は獲得関数、×は獲得関数における最大値を表す。

（a）初期の観測点を基にガウス過程モデルが構築される。このモデルをもとにして獲得関数の最大値が次に評価すべき点（×）として提案される。

（b）新しい観測点（赤点）が追加され、ガウス過程モデルが更新され、更新されたモデルを元に獲得関数も更新される。

（c）a,bの過程が繰り返され予測分布の不確実性が減少していく、すなわちガウス過程回帰による近似関数が目的関数に収束していく。これを用いることで、最終的に目的関数の取る最適解（図中では最小値）に近づく。

3.2. 菌自家蛍光スペクトルデータに対する機械学習の適用

菌自家蛍光スペクトルデータを機械学習に適用するにあたり、本節ではデータの前処理からモデルの最適化までの過程について検討した。まず得られたEEMデータを解析に適した形式へ整形するための前処理を行い（3.2.1.）、菌種同定に適した機械学習アルゴリズムを選定するための予備的な試行を行った（3.2.2.）。選定したアルゴリズムを学習、最適化、そして評価するための処理フローの設計を行い（3.2.3.）、ハイパーパラメーターのチューニングによる診断精度の向上について解析し、構築したモデルの最適化とその成績について評価を行った（3.2.4.）。

3.2.1. データの前処理

2章の実験で得られた自家蛍光のEEMデータを機械学習による解析に適したフォーマットに整形するため、以下のような前処理を実施した。

- (a) まず、2.3.で取得した各サンプルのEEMデータにラベリングを行った。励起波長と蛍光波長の組み合わせを一つの説明変数とし、その信号値を特徴量として採用した。目的変数には菌株および濁度を設定し、モデルの学習および評価に適した形式へとデータを整理した（図3-3）。
- (b) 次に、得られたEEMデータの各特徴量に対して標準化を実施した（図3-4）。標準化は各特徴量の平均を0、標準偏差を1にスケールする処理であり、特徴量間のスケールの違いを統一する。この前処理により、モデルの計算安定性が実際に向上した。特に今回の解析では、複数の機械学習アルゴリズムを適用するため、標準化によってアルゴリズム間で生じるバイアスを抑えることが重要であった。したがってデータのスケールが影響することなく、各アルゴリズムが均等に性能を発揮できるよう調整する必要がある。例えば、特定の特徴量のスケールが大きすぎる場合、一部のアルゴリズムだけが有利になる偏りが生じることがあるが、標準化によってこれを防いだ。データを統一的なスケールに整えることで、さまざまなアルゴリズムが効率的かつ一貫した学習を行えるようにする一般的な前処理方法として有効である。
- (c) また、自家蛍光スペクトルデータの多次元性への対処として次元削減を実施した。相関行列の分析から、スペクトルデータの特性として当然ではあるが隣接する信号値間に高い相関が確認された（図3-5a-d）。この多重共線性を軽減するためPCAを適用することで次元削減を行った（図3-5e）。この処理により、データの本質的な特徴を保持しつつデータ量が少ない場合に生じる高次元データの問題（the curse of dimensionalityと呼ばれる）を回避し、併せて特徴量の削減による計算効率の向上を実現した。

以上の一連の前処理を経て、機械学習に最適化されたデータセットを構築した。

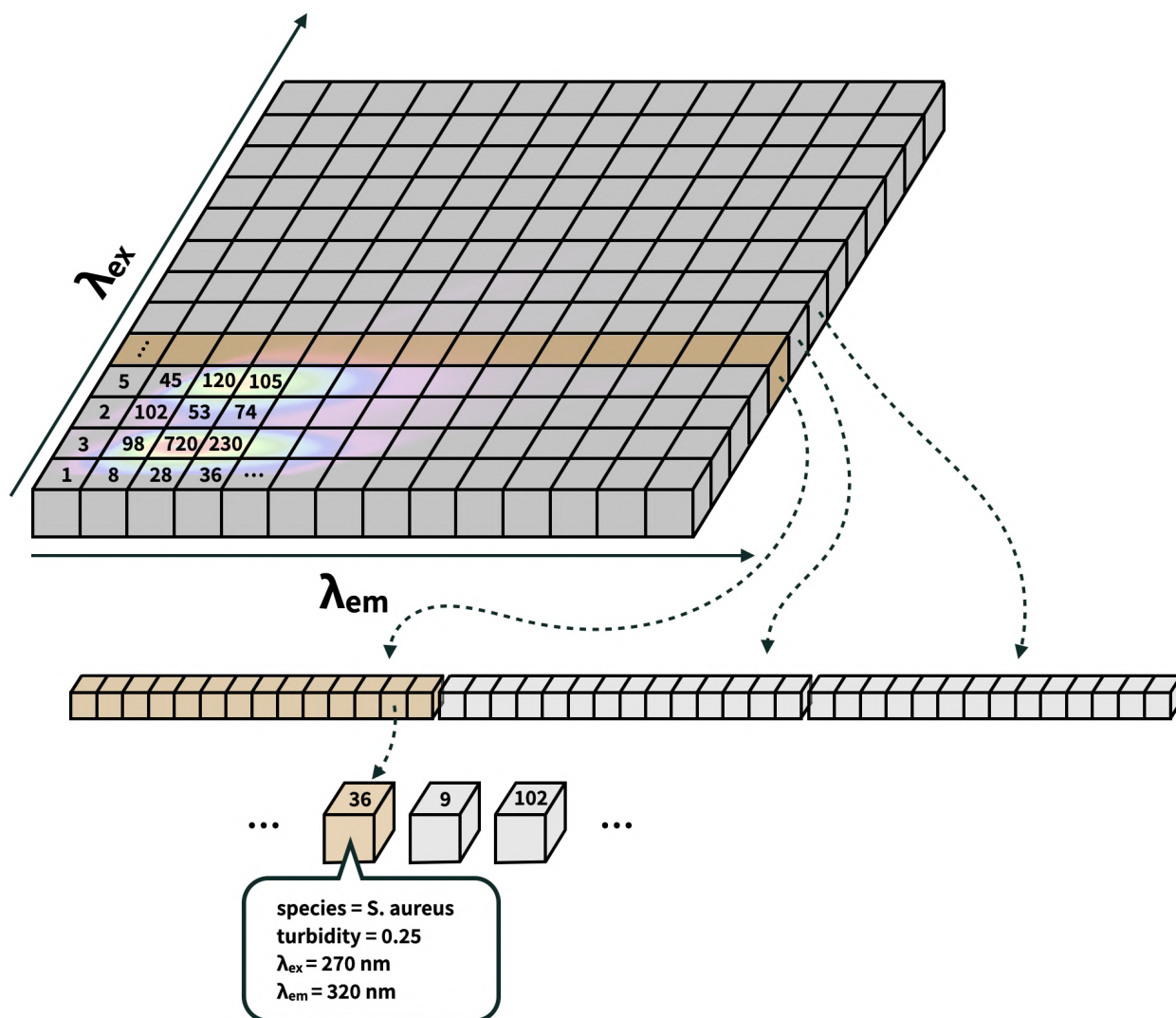


図3-3 EEMデータのラベリングとマトリクスデータの1次元化のイメージ

EEMのラベリングと1次元化のイメージ図。EEMは励起波長と蛍光波長の2次元マトリクスとして表現されており、各座標の値は蛍光強度を示している。機械学習を用いた評価を可能にするため、2次元マトリクスを平坦化し1次元アレイに変換している。個別の信号値は1次元化後もそれぞれが自身の属する菌株名、濁度、励起波長、蛍光波長に関する情報を保持するように個別にラベリングされている。

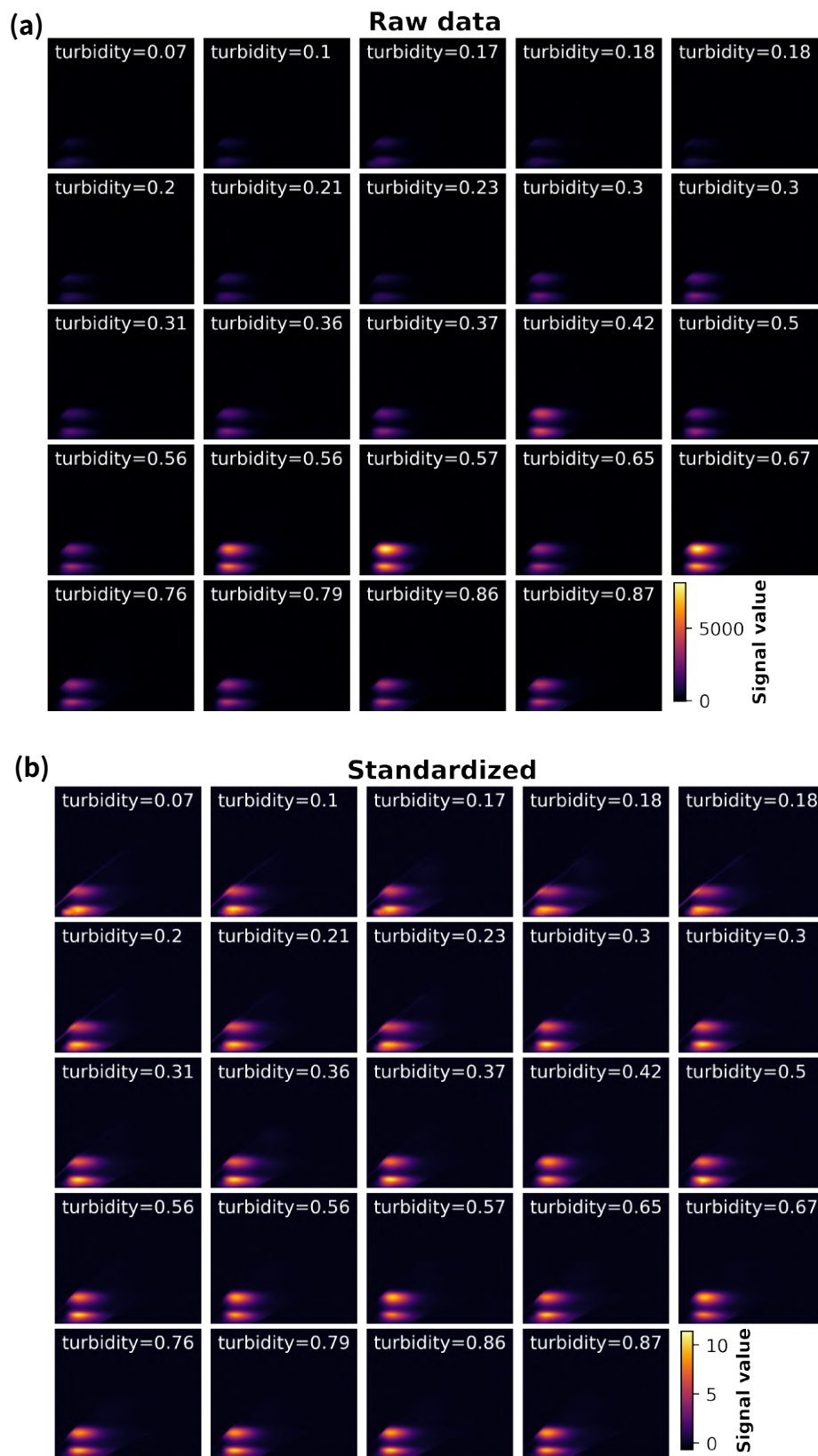


図3-4 前処理によるEEMデータの視覚的な変化

*S. aureus*の24のサンプルのEEMをカラーマップ表示し濁度順に並べたもの。シグナル強度の変化を視認しやすいように図2-3から図2-8に用いていたものと異なったカラーマップを用いている点に注意。

(a) 未処理のEEMデータ。

(b) 一つのEEM内で平均を0、標準偏差が1となるようにスケーリングし標準化したもの。全計測において計測装置の設定値が共通していることによる、サンプルごとの信号ピークの強度が補正され、全ての濁度で類似したスペクトラムとなっている。

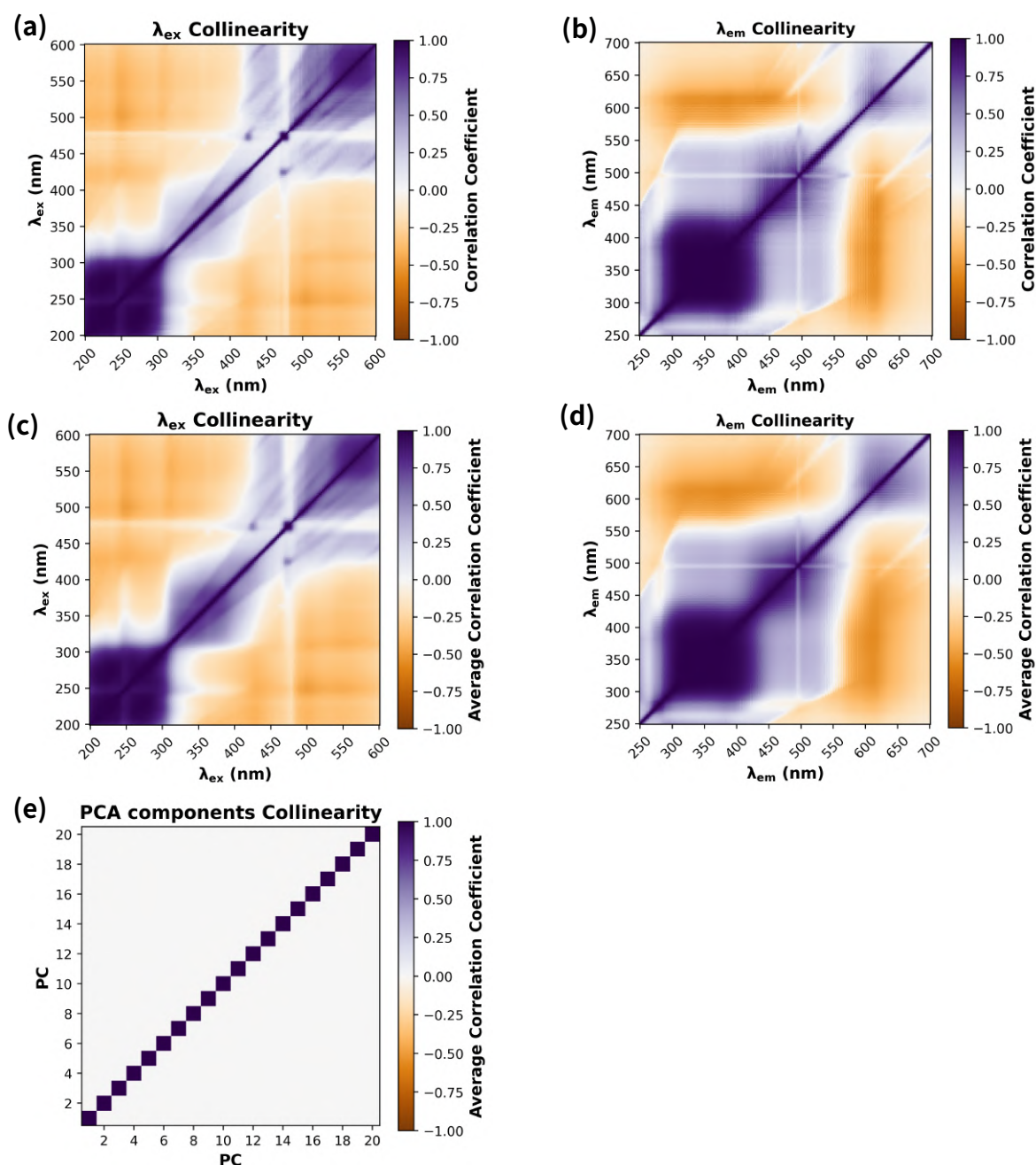


図3-5 PCAによるデータの多重共線性の解消

EEMデータの励起波長、蛍光波長による波長毎の相関係数と、EEMデータに20次元までのPCAを行った後の相関係数の平均値を示す。全てのグラフで左下から右上に向かう対角線は自分自身との相関係数の1である点に注意。

(a) *S. aureus*の濁度0.25のサンプルの励起波長毎の相関係数をヒートマップで表したものの。自身の波長に近いほど相関が強く、遠いほど相関が弱いこと、一部の波長では特に高い相関が見られ、これらの波長が類似したスペクトル特性を持つ可能性がある。475 nm付近のみ他の励起波長と相関係数が特異的に低くなっているのは、図2-4cの15で示したハードウェアに起因するノイズを表していると考えられる。

(b) aと同じサンプルの蛍光波長毎の相関係数をヒートマップで表したものの。同様に500 nm付近の低相関係数域はハードウェアに起因するノイズを表していると考えられる。

(c) 全サンプルの励起波長毎の相関係数の平均値をヒートマップで表したものの。概ね単サンプルの相関係数であるaと同じような所見が認められる。

(d) cと同様に全サンプルの蛍光波長毎の相関係数の平均値をヒートマップで表したものの。

(e) 全サンプルを20次元まで主成分分析し、主成分軸毎の相関係数の平均値をヒートマップで表したものの。PCAの原理上当然だが自身以外の主成分軸との相関が0となっている。

3.2.2. 機械学習モデルの選択と構築

3.1.で述べたように、機械学習アルゴリズムには多様な手法が存在し、解決すべき課題に適したアルゴリズムを選択することが重要である。本研究における菌種同定は「比較的少ないサンプル数を用いた教師あり学習による分類タスク」という特徴を持つため、この特性に適合するアルゴリズム群から最適な手法を選定する必要があった。

まず、利用可能な全てのアルゴリズムに対してハイパーパラメーターのチューニングを行わない初期状態での診断精度を簡易的に比較した。Pythonの機械学習ライブラリであるScikit-learnのall_estimators関数を用いて得られる利用可能な全ての分類器アルゴリズムを取得した上で、読み込んだデータセットに前節の標準化、PCAによる次元削減を行い、各アルゴリズムについて学習と評価を行うパイプラインを構築した。データセットは10個のサブセットに分割し、そのうち9個を訓練データ、1個をテストデータとして用いる10分割交差検証を独立して100回繰り返すことで、データの分布に起因する、データ分割の偶然性によるバイアスを最小限に抑えることを意図した。

各アルゴリズムによる診断精度の分布を図3-6に示す。精度はアルゴリズムごとに0.05から1の間で広範囲に分布しており、アルゴリズムの選択によって性能が大きく異なることが確認された。特に、Extra Trees ClassifierやMLP Classifier、Logistic Regression CVなどは比較的高い精度を達成し、一貫して優れた類推性能を示した。これらの分類器は分布の幅が狭く、異なるデータ分割に対しても比較的一貫した性能を発揮しており、モデルの安定性が高いと考えられる。一方、Radius Neighbors ClassifierやDummy Classifierなどは著しく低い精度を示し、平均して0.1程度に留まった。これらの分類器は今回のデータセットには適していない可能性が高い。また、Extra Tree ClassifierやSGD Classifierなど一部の分類器では精度の分布が広がる傾向があり、データ分割や条件に大きく依存して精度が変動する可能性があると考えられた。また、分布が左右非対称である場合モデルの精度が一定方向に偏っている可能性がある。また一部のアルゴリズムはラベル数に対してサンプル数が不十分でアルゴリズム自体が動作しなかったために比較対象から除外された（図3-6の注釈⁺参照）が、これはデータセットの特性がアルゴリズムの適用性に直接影響を与えることを意味している。

以上の結果から、分布幅が狭い分類器は高い汎化性能を持つ可能性が高く、データセットの変動に対して頑健であることが示唆された。一方、分布幅が広い分類器ではデータの偏りやノイズに敏感であり、過剰適合や過少適合のリスクを抱えている。したがって、分類器の選定にあたっては、単に平均精度を見るだけでなく、モデルの安定性や外れ値の影響も含めて総合的に判断することが重要であると考えられた。

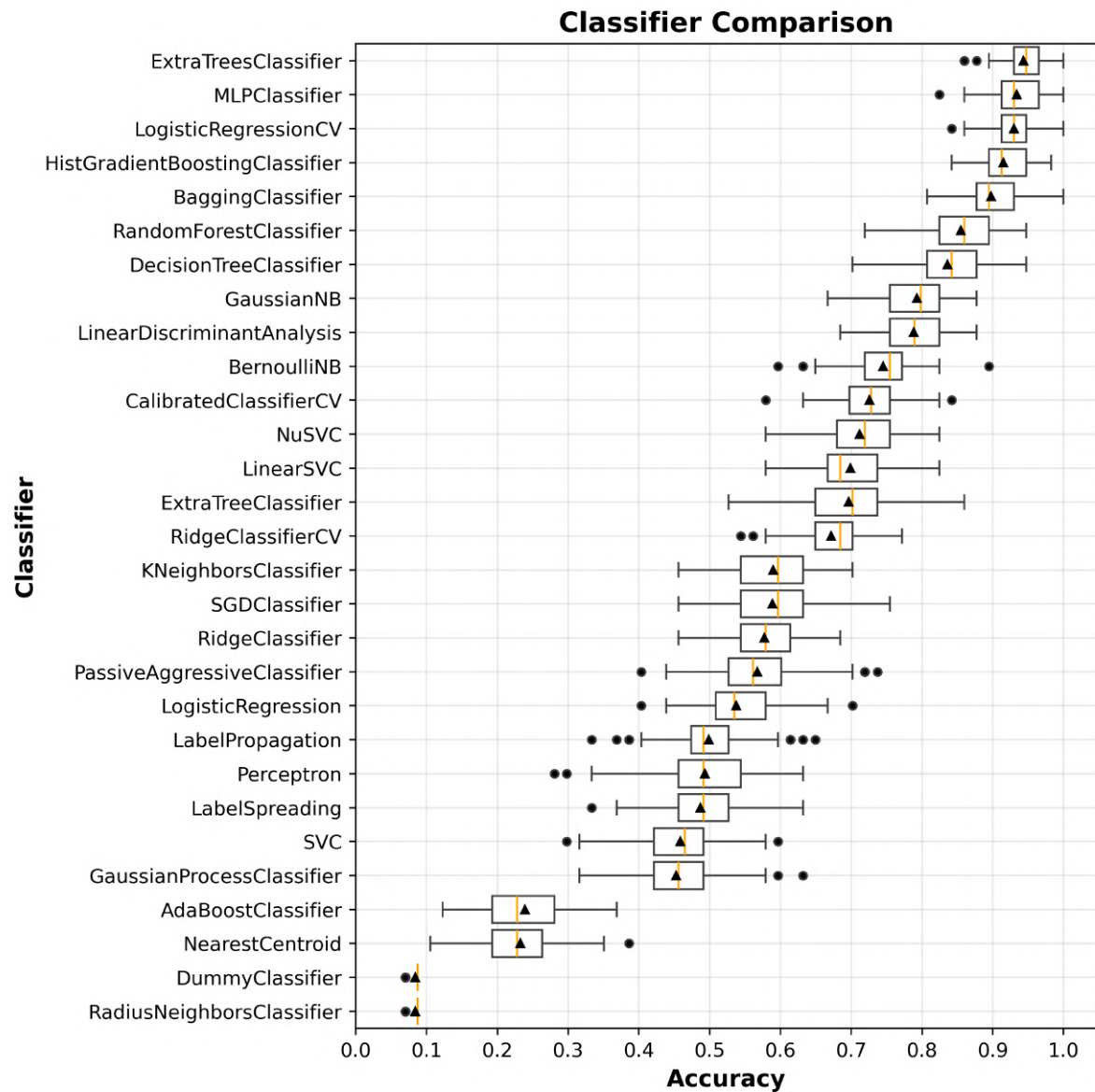


図3-6 各アルゴリズムの初期設定値での診断精度の比較

各アルゴリズムにおける診断精度の分布を示す。横軸は診断精度、縦軸はアルゴリズム名を示し、精度の平均値順に並べ替えている。箱ひげ図は100回の評価結果に基づく精度の分布を示し、▲は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を表す。ハイパーパラメータチューニングを行わない初期状態での診断精度である点と、一部のアルゴリズム+はサンプル数不足によるエラーで動作しなかったため比較対象から除外されている点に注意。

診断精度はアルゴリズムごとに大きく異なり、最も高い精度を示すExtra Trees ClassifierやMLP Classifierでは約0.9に達した一方で、Dummy Classifierなどでは0.1程度に留まった。またアルゴリズムによって精度の分布が異なっていること、上位のアルゴリズムでは分布幅が小さいことがわかる。

(除外した一部のアルゴリズム+ : Classifier Chain、Multi Output Classifier、One Vs One Classifier、One Vs Rest Classifier、Output Code Classifier、Stacking Classifier、Voting Classifier、Gradient Boosting Classifier、Fixed Threshold Classifier、Tuned Threshold Classifier CV、Categorical NB、Complement NB、Multinomial NB)

3.2.3. モデルのトレーニングと評価方法

前節での予備的な実験の結果に基づき、分布が狭く比較的高い診断精度を示したExtra Trees Classifier、Logistic Regression CV、MLP Classifierの3つのアルゴリズムを詳細な検討の対象として選択した。

Extra Trees Classifier (Extremely Randomized Trees Classifier) は、複数のモデルを組み合わせて予測するアンサンブル学習と呼ばれる手法の一つである。アンサンブル学習では、データを段階的に分割していくシンプルなモデル（決定木と呼ばれる）を複数用いる点に特徴があり、その中でも特にExtra Trees Classifierでは、Random Forest Classifierと呼ばれる従来のアンサンブル手法を基盤としながら、より強いランダム性を分割基準の選定に導入している。このランダム性の強化により、個々のモデルが多様性を持つようになり、全体としての予測性能が向上するだけでなく、過剰にデータに適応すること（過学習）を抑制する効果も得られると言われている。

Logistic Regression CVは統計学と機械学習の分野で広く利用されている分類手法であり、特に多クラス分類においてその有用性が報告されている。この手法ではデータが特定のクラスに属する確率をモデル化するものであり、基盤となるロジスティック関数を用いて入力データを予測する。比較的計算コストが低い点が特徴であり、特に線形分離可能なデータや小規模なデータセットに適した手法として知られている。CVはクロスバリデーション（Cross-Validation）を意味し、モデルの内部で自動的に性能を評価しつつ、最適なハイパーパラメーターを選択するために利用される。

MLP Classifier (Multi Layer Perceptron Classifier) は、人工ニューラルネットワークと呼ばれる数学的モデルの一種であり、特に非線形なデータの関係性を学習する能力に優れている。この手法は、入力データから特徴を抽出し、それを基に目標となる出力を予測する能力を持つ。層数やモデルの構造は柔軟に調整でき、データの特性や利用目的に応じた適切な構成を選択することで、学習効率や予測精度を向上させることが可能である。より複雑で層の多いニューラルネットワークであるディープラーニングに対して、比較的浅層のネットワークは、限られたデータ状況において汎化性能を維持しながらも、パターン認識に必要な学習を効率的に行うための合理的な選択であり、前節での予備実験で高い精度を維持できた理由であると考えられる。

前節における予備的なセットアップよりもさらに汎化性能について厳密に検証するため、アルゴリズムのチューニングを行い菌種診断モデルを作成し評価を行った（図3-7）。まず、データセットを訓練/検証用とテスト用に分割し、それぞれの比率を過去の報告に倣い訓練/検証用を90 %、テスト用を10 %とした。さらに、分割した訓練/検証用データセットにおいてさらに訓練用データと検証用データを90 %と10 %に分割し交差検証（cross-validation; CV）を適用した。交差検証は、データを複数の部分に分割し、一部を検証用、残りを訓練用として学習と検証を行うプロセスを順次繰り返す手法であり、特定のデータセットの偏りに引きずられることなく、モデル性能を包括的に評価できる利点がある。今回の研究では、90 %の訓練/検証用データセットをさらに「10のサブセット」に分割し、9つのサブセットを訓練用、残りの1つを検証用として使用するサイクルを10回繰り返す「10分割交差検証」（k-fold cross-validation）を採用した。この手法により、全データが少なくとも一度は検証用データとして使用されるため、モデル評価の信頼性が向上する。また、この方法は、すべての検証とテスト試行ごとに新たにデータを分割する従来の手法と比較して計算資源を大幅に節約できると同時に、テストデータの情報がモデルに漏洩するリスクを低減し、モデルの汎化性能を向上させる効果があるとされている。この交差検証と3.1.3.で述べたベイズ最適化を用いて、ハイパーパラメーターの最適化（ハイパーパラメーターチューニング）を30回行わせた。最終的に最適化によって得られたハイパーパラメーターを適用させた学習モデルを用いてテストデータに対する菌種の予測を行い、テストスコアの算出を行った。この一連の試行を1試行と定義し、初回のデータセットの分割による偶然性を通減するため、この試行を10回繰り返しテストスコアの分布を評価した。

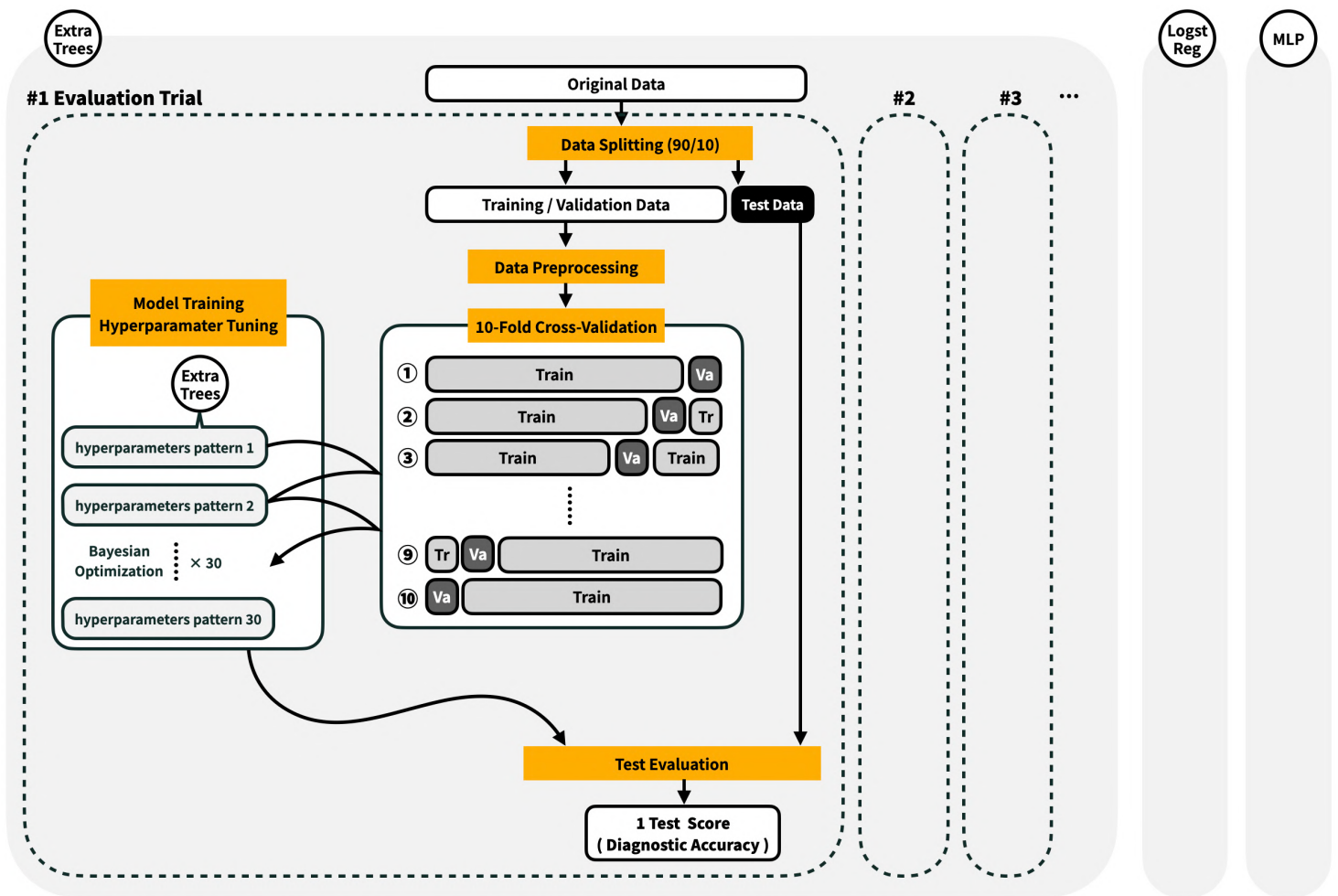


図3-7 モデルの学習から評価までのフロー

3.2.3.における機械学習の基本的な処理の流れ。元データを90 %と10 %に分割し、訓練/検証用データとテストデータに分ける。その後、データ前処理を経て10分割交差検証（10-Fold cross-validation）を実行する。検証では90 %のデータセットをさらに「10のサブセットに分割し、そのうちの9つでモデルを訓練して残りの1つを検証用に使う」というサイクルを全てのデータ組み合わせで10通り交差して繰り返す（交差検証）。1組のハイパーパラメーターに対してこの交差検証を行い、交差検証内でのスコアを最大化するようにベイズ最適化を用いてハイパーパラメーターを最適化する。最終的に得られた最適化されたハイパーパラメーターで学習したモデルを使い、最初に分割した利用していないテストデータを用いて、診断精度を算出する。ここまでの1連の試行を10回繰り返すというプロセスを、Extra Trees Classifier、Logistic Regression CV、MLP Classifierの3つのモデルで実施する。

3.2.4. チューニングによる診断精度の変化

3.2.3.で構築したモデルの評価法を用いて、ハイパーパラメーターの最適化によって診断精度の向上がどの程度生じるのかについて検証した。最適化前の標準的な変数値での精度、最適化後の診断精度、最適化したモデルを用いたテストデータの精度をモデルごとに示す（図3-8）。

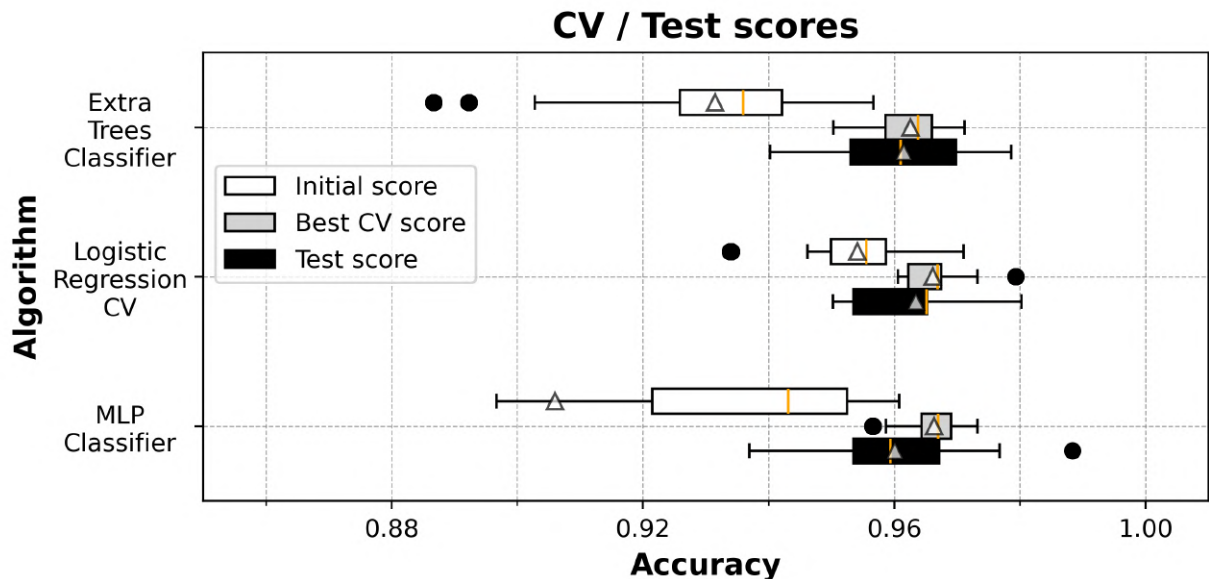


図3-8 アルゴリズム毎の最適化過程前後およびテストスコアの比較

3つのアルゴリズム（Extra Trees Classifier、Logistic Regression CV、MLP Classifier）の、ハイパーパラメーターの最適化前と最適化後の交差検証内のデータを用いた診断精度、およびテストデータを用いた診断精度を示す。箱ヒゲ図における箱はそれぞれの系列において上から最適化前（白箱）、チューニング後（灰箱）、テスト（黒箱）のスコア分布に対応する。横軸は診断精度、縦軸はアルゴリズム名を示す。箱ひげ図は100回の評価結果に基づく精度の分布を示し、△は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を表す。

いずれのアルゴリズムにおいても最適化によってスコアの平均値と中央値が向上している。Logistic Regression CVはそのアルゴリズム内にCVを内包しているため最適化前から性能が安定しており、交差検証における改善幅が小さい。いずれのアルゴリズムでも、テストスコアは交差検証時と比較して分布の分散が大きい傾向があった。

まず、すべてのモデルにおいて最適化前と比較して最適化後の方が平均値、中央値いずれも高い精度を示した。特にExtra Trees ClassifierとMLP Classifierで大きな改善が見られ、最適化が効果的に機能したことを示している。一方で最適化後とテストデータを比較すると、全てのモデルでテストデータの方が精度の分散が大きく、さらに実際のテストデータでの診断精度は、訓練/検証データセット内で最適化した最終的なモデルほどの精度が得られていないことがわかった。これはモデルの汎化性能にばらつきがあることを示しており、データセットにおける特徴量データのサンプルごとの分布の特性に起因する影響を最適化過程において受けている可能性がある。1段目の分割までを含めた1試行の数をより増やすことで、相対的にこの分散を小さくすることができる可能性がある。

それぞれのモデルを比較してみると、いずれのモデルも最適化による訓練/検証用データセット内での最終的な精度は平均して安定してほぼ97 %前後に到達するが、実際のテストデータによる結果ではLogistic Regression CVの精度が平均値、中央値、分散のすべての面で高い結果となった。

続いてそれぞれのアルゴリズムの最適化過程について検討した。ハイパーパラメーターの最適化過程における、最適化回数に対するアルゴリズムごとの精度の推移を示す。（図3-9）。

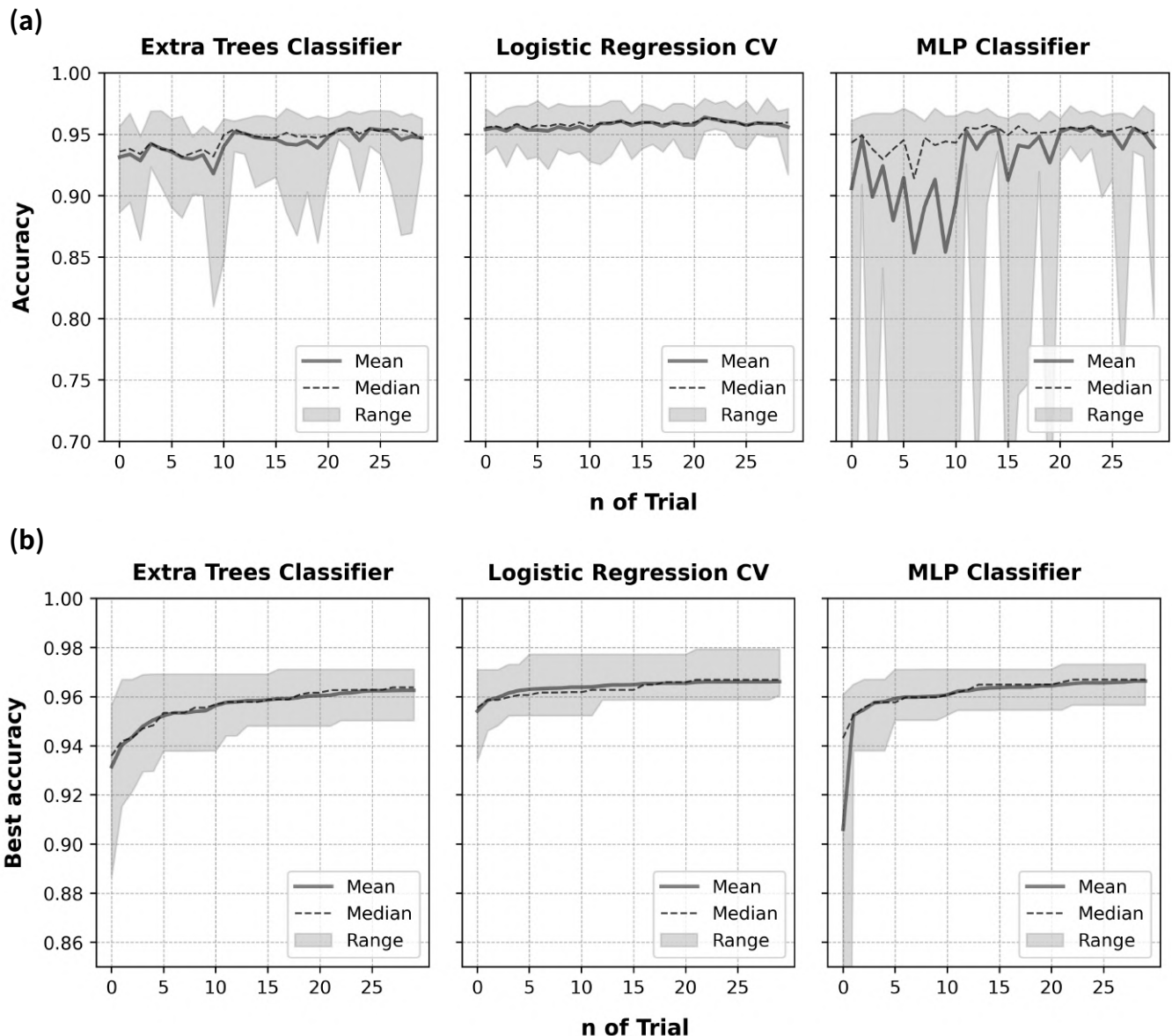


図3-9 アルゴリズムごとの最適化過程における診断精度の比較

ベイズ最適化を用いたハイパーパラメータの最適化過程における、最適化回数に対するアルゴリズムごとの精度の推移。縦軸は（a）1組のハイパーパラメータセッティングでの各最適化試行における精度、および（b）各最適化試行終了時までの最良精度、横軸は最適化回数。灰色の帯は初回のデータセット分割が異なる10試行における、各最適化試行内における最小値から最大値の範囲を、黒線はそれらの平均値、点線はそれらの中央値を表している。最適化前の初回の試行はx軸で0として表示されている点と、（a）および（b）でy軸の下限が異なる点、そもそもテストデータに対する精度ではなく、あくまで交差検証によって得られた診断精度である点に注意。

（a）最適化試行回数ごとの診断精度の変動。アルゴリズムごとに精度の揺れや収束性の違いが観察され、Logistic Regression CVは試行による変動が少ない、つまりハイパーパラメータの変化による精度の変動が少ない。一方でMLP Classifierでは1試行ごとの変動幅が大きく、ハイパーパラメータによる精度の変動が多いことがわかる。

（b）Extra Trees Classifierは初期から交差検証の回数を重ねる毎に精度が改善し、最適化試行30回目付近でも僅かに改善し続けている。一方Logistic Regression CVは初期から高い値を示し改善の傾向は緩やかである。MLP Classifierは初期段階で急速な改善が見られ、その後安定して高い精度を維持していることがわかる。

Extra Trees Classifierでは、初期の試行における精度の変動が他のアルゴリズムと比較してやや大きいものの、試行回数の増加に伴い精度が収束し、中央値と平均値がほぼ一致する傾向が見られた。特に、最適化試行の30回目付近でも僅かながら改善が続いており、さらなる最適化の余地があることが示唆される（図3-9a）。

Logistic Regression CVでは、試行回数の増加に伴い精度の分布が安定し、平均値および中央値がほぼ一致する形で高い精度を維持していた。このアルゴリズムは初期段階から高い精度を示し、ハイパーパラメーターの影響を受けにくい特性が確認された。全体的な変動幅が初期から最適化後半までを通して比較的小さく、データのランダム性や外れ値の影響を受けにくいことが示唆される（図3-9b）。

MLP Classifierでは、初期の試行が他アルゴリズムよりも僅かに低いものが多いが、数回の最適化で急激な精度向上を示す。しかしその後の精度変動が大きく、学習によって形成されるモデルの性能の不安定性が示唆される。試行回数の増加によって精度の平均値が向上し、範囲も狭まる傾向が観察されたものの、初期条件や学習パラメーターに敏感である可能性がある（図3-9c）。最終的には高い精度に収束し、他アルゴリズムとほぼ同様の診断精度に到達した。

以上のように最適化回数の増加は全てのアルゴリズムにおいてモデルの精度安定性を向上させる要因となっているが、その影響はアルゴリズムごとにやや異なる特性を持つことが明らかとなった。また、グラフ形状から今回の設定条件の下では、それぞれの試行内におけるベイズ最適化を用いたハイパーパラメーターチューニングは、およそ20回から30回の最適化試行で改善度は収束していると考えられる。さらに、いずれのモデルにおいてもクロスバリデーション内での最終到達診断精度はおよそ96から97 %の間に収束した。ただしこれらはテストデータに対する診断精度ではなく、あくまで交差検証によって得られた診断精度である点には注意が必要である。前節で述べたように交差検証に対して高い診断精度を与えるモデルが、必ずしもテストデータでも同じ値をとるわけではない。

実用的な観点から評価すると、Extra Trees Classifierは継続的な精度改善を示すものの、収束に時間を要するため、最適化に関して計算リソースが要求される。一方、Logistic Regression CVは少ない試行回数でも安定した性能を発揮し、計算リソースを効率的に活用できる。MLP Classifierは早期に高精度に到達するものの、精度変動が大きく安定性に課題が残る。

さらに最適化における各ハイパーパラメーターの値と精度についてもアルゴリズムごとに検討した（図3-10）。Extra Trees Classifierでは、PCAも含めて与えた全てのパラメーターが精度に影響を与えることが明らかとなった。特に、推定器の数（n_Estim）やツリーの最大深さ（Max Depth）は中間値（15～20付近）で最適な性能を示し、適度なモデルの複雑さが精度向上に寄与していることを表している。一方、分割に必要な最小サンプル数（Min Split）やリーフノードの最小サンプル数（Min Leaf）は相対的に小さい値がモデルに適しており、これらのパラメーターが木の構造を直接制御し、モデルの汎化能力と過学習防止に影響を与えている可能性がある。

Logistic Regression CVでは、その内部にモデルの性能を最適化するための自動調整機能を有しているアルゴリズムであるため、チューニング可能なパラメーターは正則化パラメーター（Cs）のみである。結果としてこの値が小さいほど相対的に診断精度が高いことがわかった。正則化が適切に働くことで過学習を防ぎつつ、モデルの予測能力を維持していることを示していること、また今回のデータセットではモデルのサンプル数が相対的に少ないが、正則化の強度を高めることでモデルの自由度が制限され、過剰に複雑なモデルが構築されることが防がれた結果、過学習のリスクが低減され、訓練データに対する過度な適合を避けつつ、汎化性能が向上したことを表していると考えられる。

MLP Classifierでは、レイヤー数自体はモデルの性能に大きな影響を与えないものの、レイヤー0（入力層）とレイヤー1（第1隠れ層）のノード数が一定値以上であることが高い診断精度のために必要であることが判明した。しかし、ノード数が大きすぎる場合には精度が低下する傾向があり、過剰なモデルの複雑化が過学習を引き起こす可能性が示唆される。さらに、Logistic Regression CVと同様に初期学習率

(LR Init) とL2正則化係数 (Alpha) は小さい値が望ましが確認できた。必要以上に深いネットワークは避け、過学習のリスクを最小限に抑えることが重要であることを表していると考えられる。

総じて、各分類器においてハイパーパラメーターが精度に大きな影響を及ぼすが、その最適値は一意に定まらず、一定の幅を持っていることが多いことがわかった。特に、各アルゴリズムは異なる特性を持ち、それぞれのパラメーター設定がモデルの性能を大きく左右するため、これらの値の最適化は各アルゴリズムの特性を理解した上で行う必要がある。また、全てのモデルにおいてPCAによる次元削減後の成分数が20~30の場合に高い精度を示し、データの本質的な特徴を保持しつつノイズを削減する最適点が存在することが示唆された。

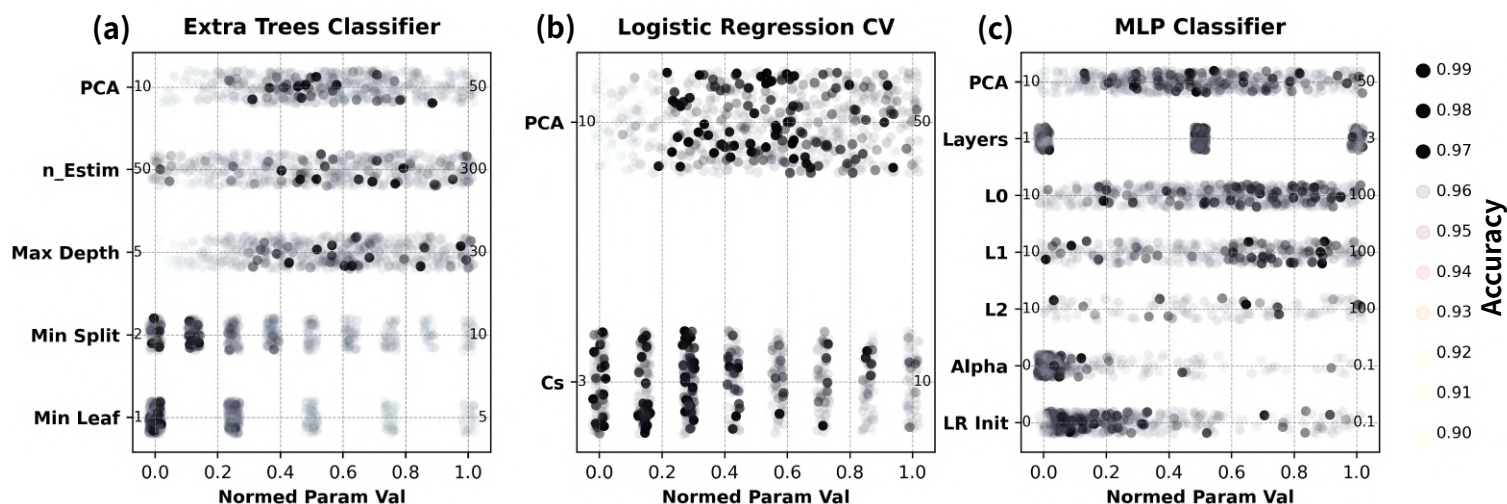


図3-10 アルゴリズムごとのハイパーパラメーターと診断精度との関係

モデルごとのハイパーパラメーターの、正規化された値 (x軸) と精度 (色の濃淡) の散布図。y軸は各アルゴリズムのハイパーパラメーター名を示し、それぞれの左端と右端には正規化前の最小値と最大値を表示している。精度はカラーマップで表示され、色が暗いほど性能が良いことを示す。いずれのモデルでもPCA数が極端に低い場合に精度が落ちる傾向があった。

(a) Extra Trees ClassifierではMax DepthやMin Splitの調整が性能向上に重要であると考えられる一方、PCAやn_Estimといったハイパーパラメーターの範囲全体においては分布が比較的一様である。

(b) Logistic Regression CVのCsのハイパーパラメーターでも分布が比較的一様である。

(c) MLP Classifierではレイヤー数 (Layers) は精度にあまり影響を与えないが、レイヤー0とレイヤー1におけるノード数 (L0とL1) の最適化が重要であることがわかる。また初期学習率 (LR Init) とL2正則化の重み付け (Alpha) の値も大きな影響を与え、両者は小さいほど精度が高くなる。

最後に、各最適化試行後のテストデータに対する正解ラベルと誤答ラベルの比較（混同行列の作成）を行った（図3-11）。最適化した3つのアルゴリズムのモデルはいずれも概ね90 %以上の精度で菌種を同定できた。特に、Extra Trees Classifierにおける*E. coli* (8739) やLogistic Regression CVにおける*P. aeruginosa* (35422) のように、テストデータの分割方法に関わらず10回全ての試行で100 %の精度で菌株名を診断できる菌株も存在した。一方、*E. coli* (25922) のように相対的に誤答しやすい菌株が存在すること、各モデルにおけるこれらの誤分類は同じ菌株で生じる傾向があること、さらに誤答の菌株も類似しており、また同じ菌種に属する別菌株を混同しやすいわけではないということがわかった。これは、古典的な微生物学的分類（嫌気性や好気性などの生育環境の嗜好、代謝産物、コロニーの形態など）による菌株の類縁性と、光学的見地から自家蛍光スペクトルを基にした菌株の分類における類縁性が必ずしも一致しないことを示唆している。

しかしモデルごとに精度が異なる結果となったものも存在することから、重要な菌株の判定には複数のモデルの結果を組み合わせる（より高次の意味でのアンサンブル手法）ことで菌種の正答率を上げる、あるいは誤答している可能性があるモデルが判断する精度を算出できる可能性がある。また、混同した菌種間の誤分類を減らすために、逆に属内の特徴をより詳細に捉える特徴量を得るためのハードウェア側の改善を行うことも有効だと考えられる。なお3.1.2.で述べたように、ラベル数に対する各ラベルのサンプル数が相対的に不足している可能性があり、これらの混同行列に見られる菌株ごとの差異は学習データの不均衡性に起因する可能性もある。

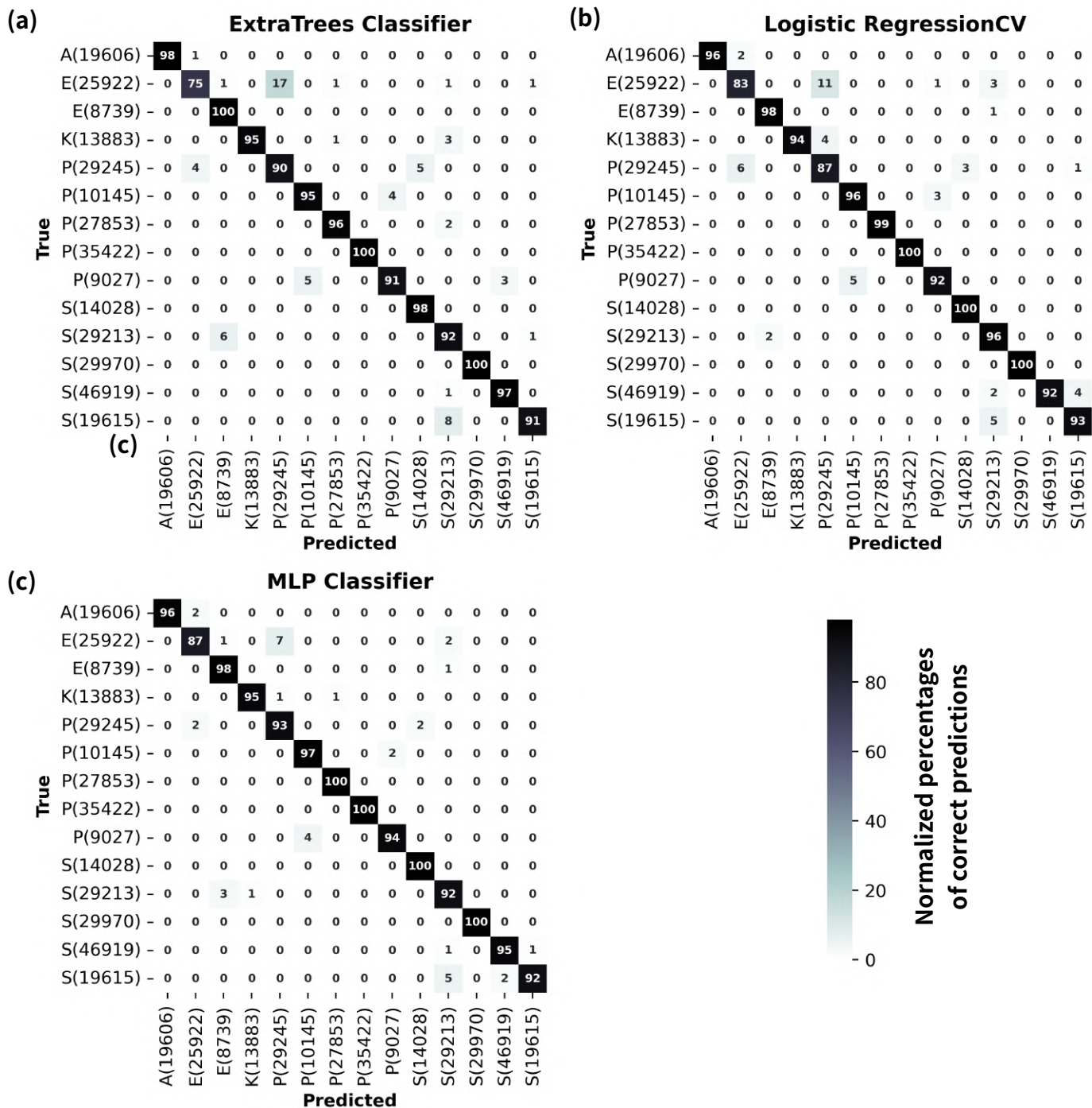


図3-11 アルゴリズムごとのラベル推定の混同行列

モデルごとの推定菌株名ラベルと正解菌株名ラベルとの正誤率を表す混同行列。行列の各要素は10回の各試行後のテストデータに対する結果の平均値として計算し、正規化した数値をラベルごとに整理したもの。縦軸は実際の菌株名ラベル名（True）、横軸は予測された菌株ラベル名（Predicted）を表す。値の高い部分は濃い色で強調されている。自身と相対する対角線での高値は正答率が高いことを、それ以外の要素での高値は誤答率が高いことを意味していることに注意。いずれも同じ菌株を別の同じ菌株と誤答している傾向があること、一方でその誤答率には（比較対象が0であった場合を除いて）最大で4倍の差があることがわかる。

3.3. 励起波長の診断精度への影響

前節で構築した機械学習モデルを用いて、菌種診断における励起および蛍光波長の影響を詳細に解析した。まず単一の励起波長による蛍光スペクトルを用いた場合の診断精度を評価し、最適な波長帯域を特定する（3.3.1.）。同様に2波長の組み合わせ（3.3.2.）および3波長の組み合わせ（3.3.3.）によるスペクトルデータを用いて、診断精度の向上と波長選択の最適化を試みた。さらに4波長以上のスペクトルを利用した場合の効果を検討し、必要最小限の波長数で高精度な診断が可能かを探った（3.3.4.）。

3.3.1. 単波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について

前節では全励起波長による蛍光スペクトルを学習および推論に使用したが、単一の励起波長による蛍光スペクトルのみしか使わない場合に、診断精度が選択した励起波長によってどのように変化するかについてを検討した。まず全励起波長による蛍光スペクトルデータを含む元来のEEMデータセットから、任意の励起波長による蛍光スペクトルのみをサンプルごとにラベルを付けて抽出し新たなデータセットを作成した（図3-12）。抽出する励起波長を200から600 nmまで2 nm刻みに変化させ、その都度新たなデータセットを作成し、図3-7で示したものと同一のフローでモデルの学習と交差検証、最適化、およびテストデータによる評価を行った。

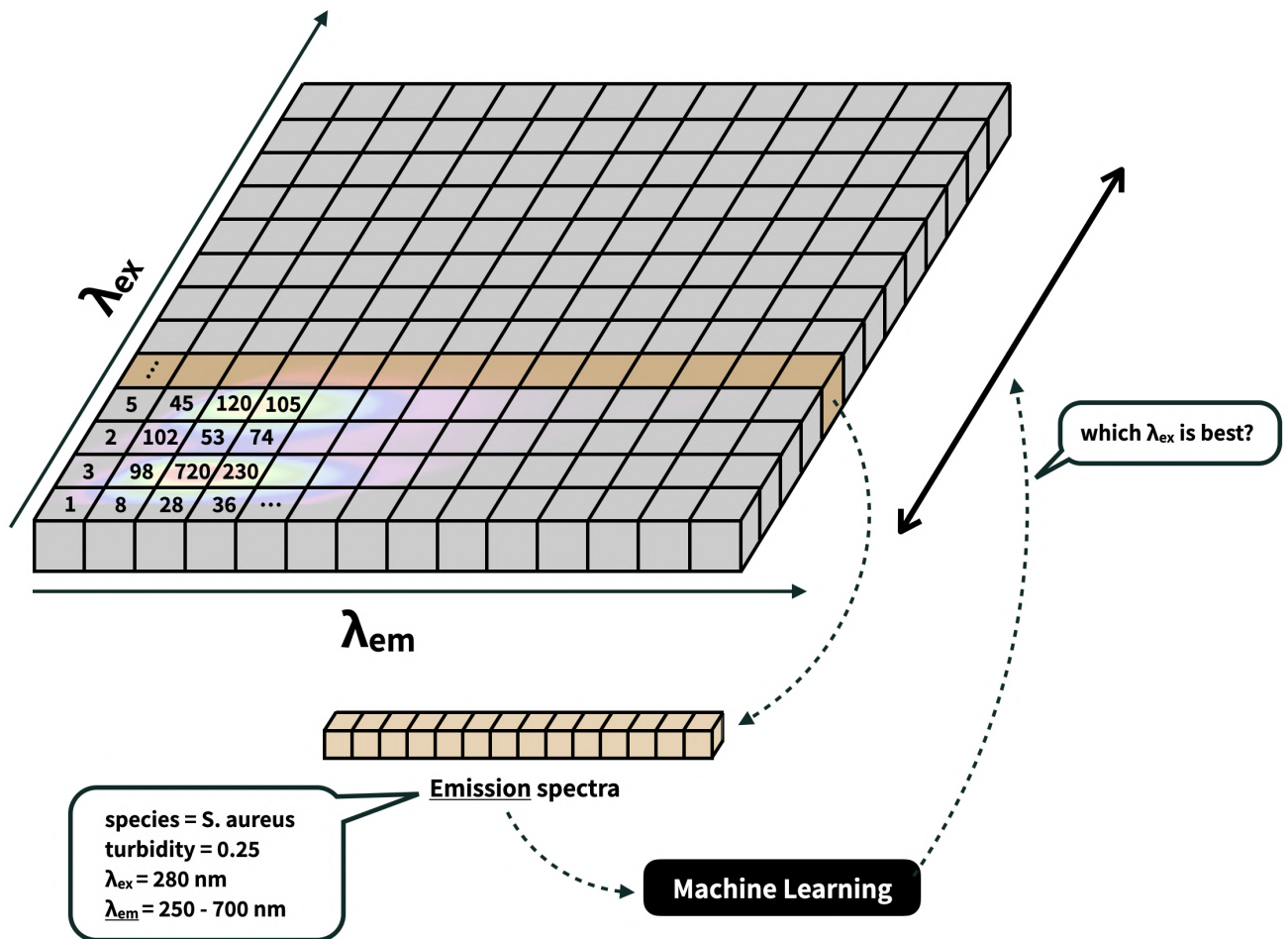


図3-12 単波長の励起光による蛍光スペクトルを使った機械学習のイメージ

例として*S. aureus*の濁度0.25のEEMから280 nmの励起光による蛍光スペクトルを抽出し、機械学習する場合のイメージ。図3-3との違いに注意。

単一の励起波長を用いた場合の学習モデルの診断精度の、励起波長との関係を図3-13と図3-14に示す。まず全体的な傾向として、いずれのアルゴリズムにおいても励起波長によって診断精度が異なることが確認された。特に、励起波長200～300 nmの範囲（その中でも230 nmと280 nm付近）、および460 nm付近で高い診断精度が得られる傾向が見られた。これらの高精度を示す励起波長の前後の波長でも同様に高い精度が得られ、診断精度と波長の関係性は隣接する波長で連続性があることが明らかになった。さらに波長帯域ごとの特徴を詳しく見ると、240～300 nm帯域では安定して高精度を維持しておりモデル間のばらつきも比較的少ない。この領域は1励起波長のみを学習および診断に用いる場合には最適な波長帯であると判断できる。一方、320～400 nm帯域では精度の大きな低下と変動が見られ、特にMLP Classifierでは精度低下および精度の分散が大きいことが確認された。420～460 nm帯域では比較的高い精度を維持しているが、長波長になるほど精度が低下することもわかった。最適化後の交差検証内での精度の平均値とテストデータに対する精度の平均値は、全モデルにおいてほぼ等しく、波長ごとの精度の高低についても同様の傾向を示している。図3-8で示した結果と類似の結果であり、EEMの全データを使った場合と同じく1励起波長による蛍光スペクトルを抽出した場合でも、構築した学習フローを経たモデルの汎化性能が良好であり、データセット全体で一貫したパフォーマンスを発揮していることを示唆している。一方でモデル間の性能差が顕著に表れるのは、320～400 nmの波長領域である。この領域では、Extra Trees Classifierが安定した性能を示す一方、MLP Classifierは交差検証内、およびテストデータいずれにおいても最低で30 %程度まで精度が低下する場合があった。Logistic Regression CVも精度低下を示すが、その程度はMLP Classifierよりも小さかった（図3-14）。

また各アルゴリズムに特徴的に見られることとして、まずExtra Trees Classifierは、全波長域で最も安定した性能を示し、波長ごとの精度の変動が最も小さいことが特徴である。特に200～300 nmの波長範囲で優れた性能を発揮し、交差検証内での精度とテストデータでの精度が波長全域にわたって乖離しない。ロバスト性が高く、汎化性能も良好であり、実用的な診断システムに最適と判断できる（図3-13a）。Logistic Regression CVの場合もExtra Trees Classifierと同様に全般の波長にわたって精度は安定しており、さらに高波長域での精度低下が緩やかである。一方で診断精度が高い領域では、交差検証内での精度とテストデータでの精度の乖離が小さいが、精度が低い領域ではこの乖離が大きくなる傾向が見られた。シンプルなモデルながら比較的良好な性能を示し、計算コストとパフォーマンスのバランスが取れていると考えられた（図3-13b）。MLP Classifierは他のモデルと比較して精度の変動が大きく、最も不安定な挙動を示している。特に300～500 nmの波長域で診断精度に試行内で幅があり、特定の波長で急激な精度低下が見られる（図3-13c）。いずれもデータセット内でのデータ分布に起因する、データセット分割時の偶然性が原因にあると考えられ、学習データの性質にモデルの学習が大きな影響を受けているためと考えられた。

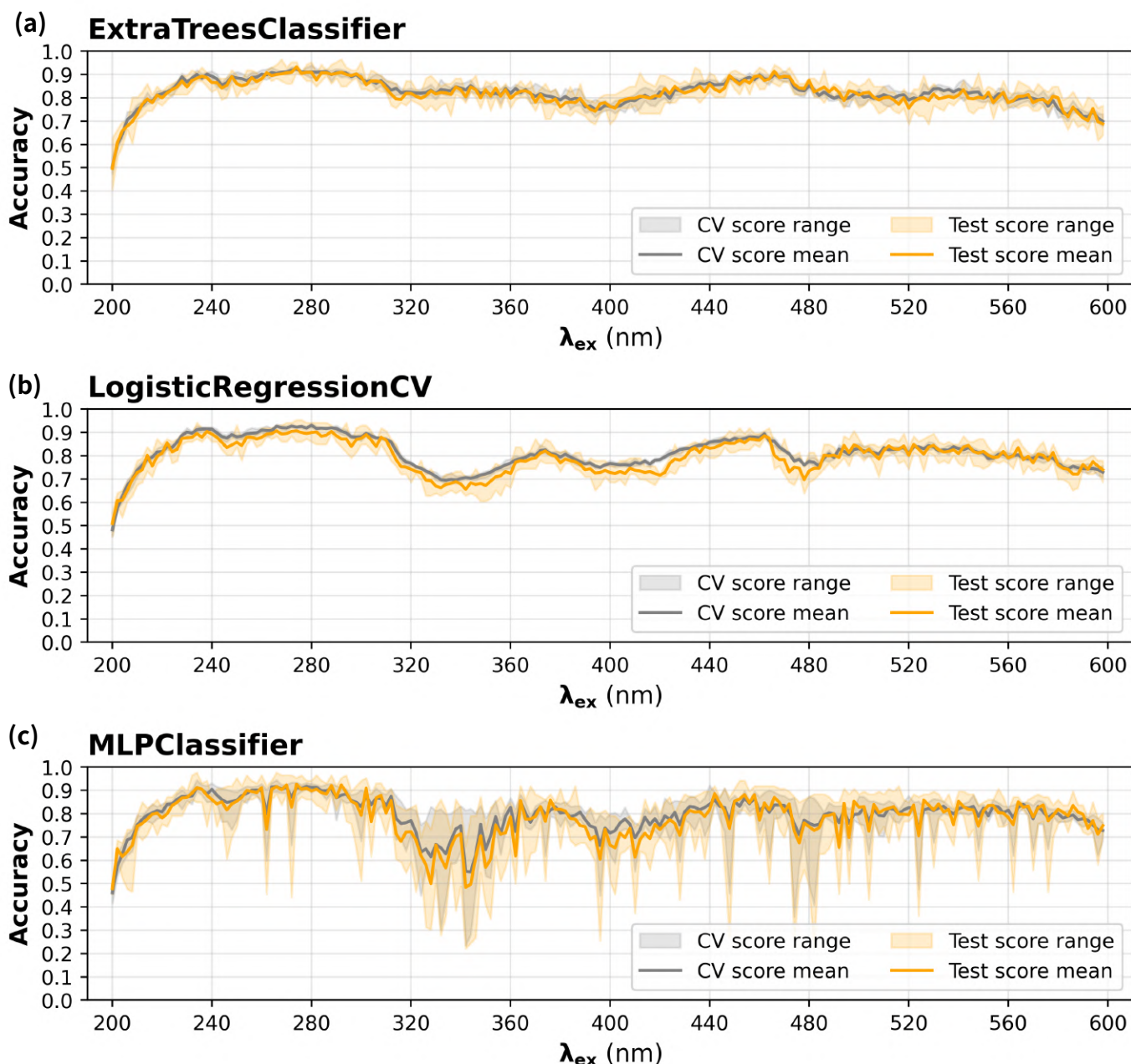


図3-13 単一の励起波長を用いた場合の精度と励起波長の関係

単一の励起波長による学習モデルの診断精度の、励起波長との関係を示す。縦軸は診断精度、横軸は学習に使用した蛍光スペクトルを生じる励起波長、黒線は最適化後の交差検証内での10試行の精度の平均値、灰色の領域はその上下限、橙線は最適化後のテストデータに対する診断精度の平均値、黄色の領域はその上下限を表す。

いずれのアルゴリズムでも励起波長によって診断精度が異なることと、最適化後の精度の平均値とテストデータに対する精度の平均値はほぼ等しく、波長ごとの精度の高低についても同様の傾向を示すことがわかる。

(a) Extra Trees Classifierの場合。全波長域で比較的安定した分類精度を示し、特に200～300 nmの波長範囲で優れた性能を発揮している。交差検証内での精度とテストデータでの精度が波長全域にわたって乖離しない。

(b) Logistic Regression CVの場合。高波長域での精度低下が緩やかである。診断精度が高い領域では交差検証内での精度とテストデータでの精度の乖離が小さいが、相対的に診断精度が低い領域ではこの乖離が大きくなる傾向がある。

(c) MLP Classifierの場合。他のモデルと比較して精度の変動が大きく、特に300から500 nm域での診断精度に試行内で幅があることがわかる。

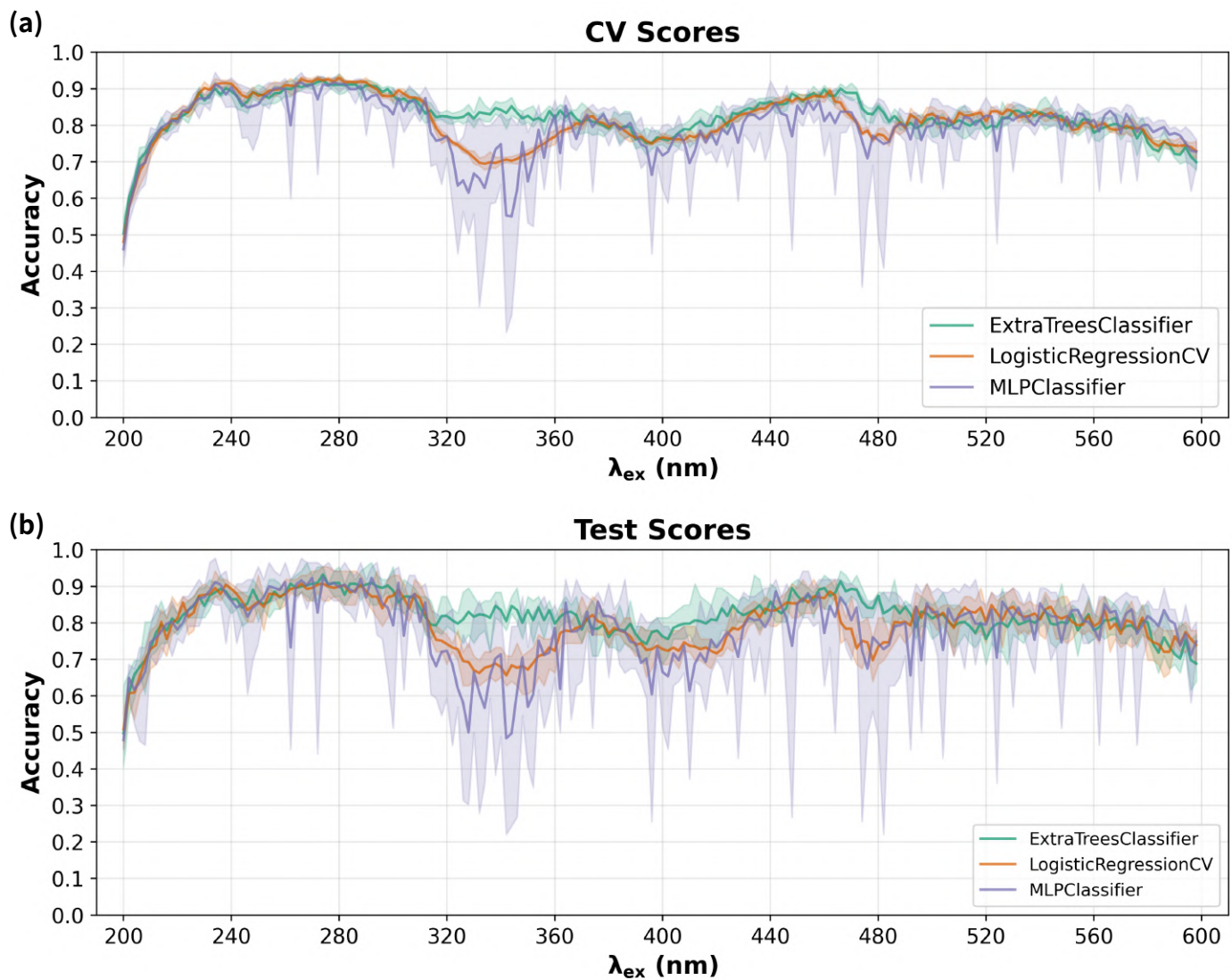


図3-14 単一の励起波長を用いた場合の精度と励起波長の関係

図3-13を交差検証での精度およびテストデータでの精度ごとにまとめたもの。

いずれのアルゴリズムにおいても、波長によって診断精度にばらつきがあること、励起波長 200～300 nm の範囲（特に 230 nm と 280 nm）および 460 nm 付近で高い診断精度が得られる傾向があることがわかった。これら高精度を示す波長の前後でも同様に高い精度が得られ、診断精度と波長の関係性は隣接する波長で連続性があることが確認された。

3.3.2. 2波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について

さらに抽出する波長を1波長から2波長に増やした場合の診断精度の変化について検討した。

3.3.1.と同様にまず全励起波長による蛍光スペクトルデータを含む元来のEEMデータセットから、任意の2励起波長による蛍光スペクトルを抽出し軸方向に結合して1次元化した新たなデータセットを作成した(図3-15)。抽出する励起波長を200から600 nmまで2 nm刻みに変化させ、その都度新たなデータセットを作成し、モデルの学習と交差検証、最適化を行った。ただし3.3.1.の結果を踏まえ、最適化後の交差検証による精度とテストデータによる精度に大きな乖離がないことから、計算資源の節約のためにテストデータによる評価を省略し、交差検証内での精度についてを比較した。

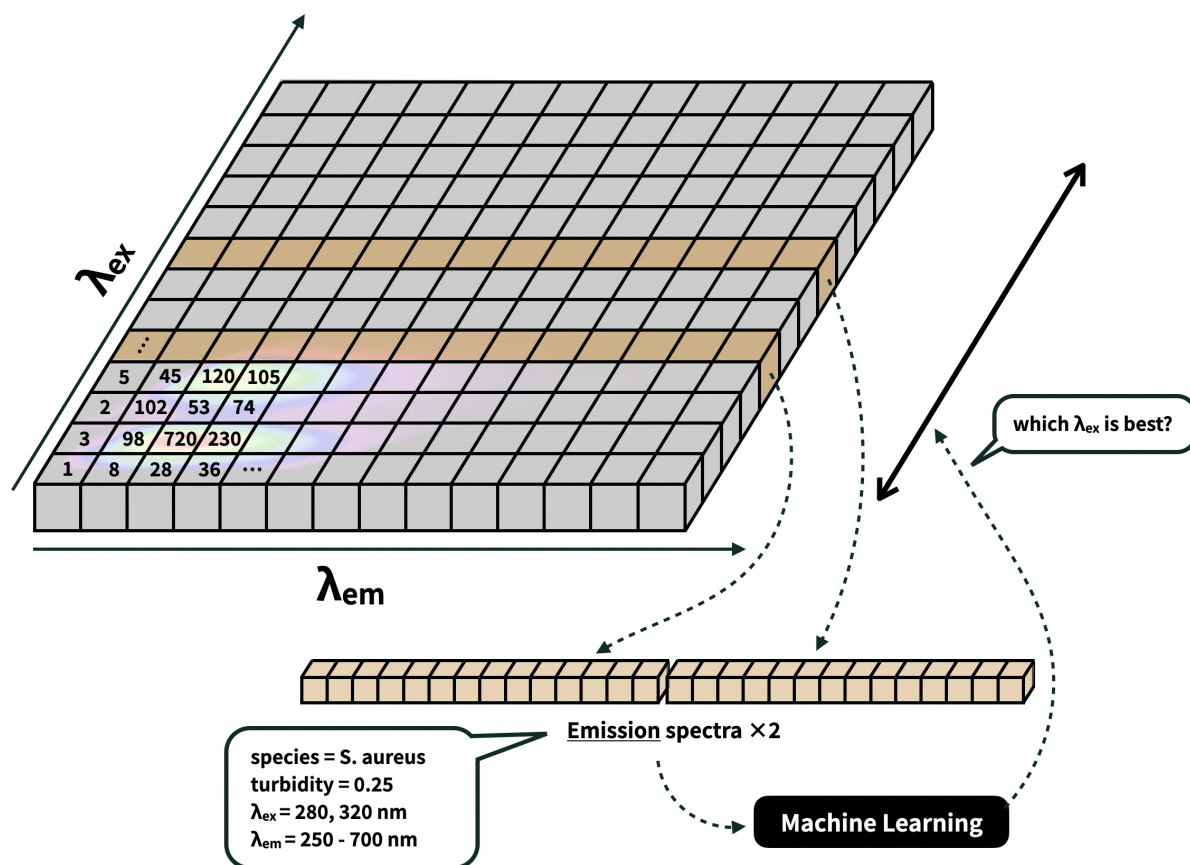


図3-15 2波長の励起光による蛍光スペクトルを使った機械学習のイメージ

例として*S. aureus*の濁度0.25のEEMから280 nmの励起光と320 nmの励起光による蛍光スペクトルを抽出し、機械学習する場合のイメージ。

2つの励起波長による蛍光スペクトルを学習に用いた場合の診断精度の、波長組み合わせごとの分布を図3-16に示す。いずれのモデルにおいても、特定の波長の組み合わせにおいて97から98 %までの高い診断精度を達成する領域が形成されていることが明らかになった。特に3.3.1.で示された2つの波長領域、すなわち280 nmと460 nm領域を含む波長組み合わせで高い精度が得られた。一方、2つの波長が近接する($\lambda_{ex2} \approx \lambda_{ex1}$)、すなわち対角線に非常に近接した領域では精度の低下が観察され、これはスペクトルデータに含まれる情報の重なりに起因するものと考えられた。3.3.1.で示された、1励起波長のデータを用いた場合に高い精度が得られる波長領域、および精度が低くなる波長領域が、2励起波長の組み合わせとして用いる場合にも同様の傾向であることがわかった。しかし各モデルを比較してみると、2つ励起波長を用いる場合には、総じてLogistic Regression CVで最も高い診断精度が得られた。1励起波長の場合と比較して含まれる情報量が増えることによるモデルの学習を経た診断精度への寄与が、モデルごとに異なっている可能性を示唆している。しかしいずれのモデルにおいても高い精度を得られる励起波長組み合わせペアの分布は類似したパターンとなった。

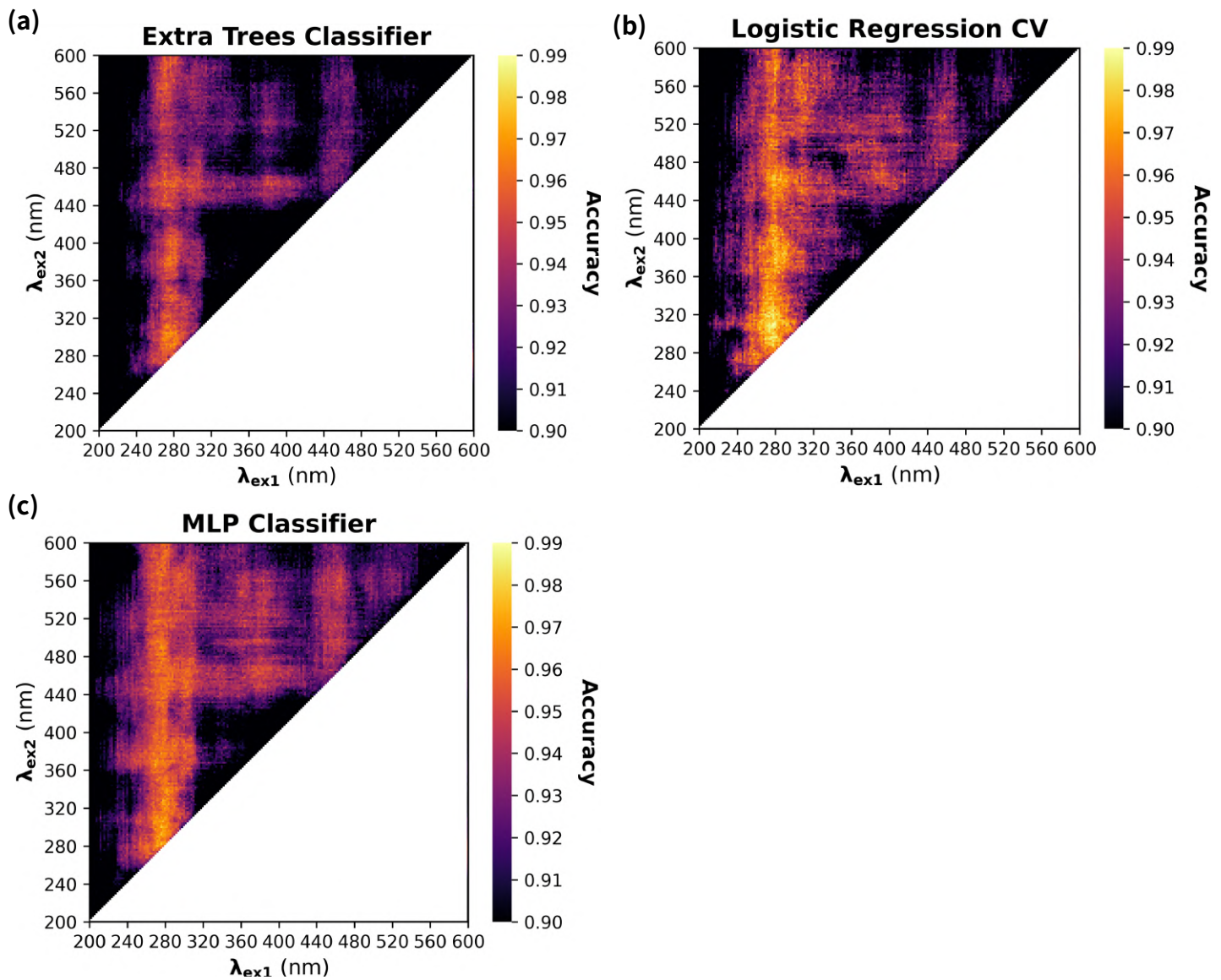


図3-16 2つの励起波長を用いた場合の精度と励起波長の関係

2つの励起波長による蛍光スペクトルを学習に用いた場合の診断精度の、波長組み合わせごとの分布。縦軸は1つめの励起波長、横軸は2つめの励起波長を表す。色は各試行内で交差検証による最適化を経た最終診断精度の、10試行回数の平均値を表し、明るいほど精度が良いことを表す。 $\lambda_{ex1} < \lambda_{ex2}$ の条件によってプロットはグラフの左上半分に限定されていることに注意。いずれのモデルにおいても、特定の波長の組み合わせにおいて97から98%までの高い診断精度を達成する領域が形成されており、特に280 nmと460 nm領域を含む波長組み合わせで高い精度が得られている。一方で2つの波長が近接する領域では精度が低下している。これらの励起波長組み合わせペアの精度の分布パターンはいずれのモデルにおいても類似したものとなった。

3.3.3. 3波長のスペクトルを用いた場合の診断精度について

さらに抽出する波長を3波長に増やした場合の診断精度の変化についても検討した。

全励起波長による蛍光スペクトルデータを含む元来のEEMデータセットから、任意の3励起波長による蛍光スペクトルを抽出し軸方向に結合して1次元化した新たなデータセットを作成した（図3-17）。3.3.2.と同様に、計算資源の節約のためにテストデータによる評価を省略し、交差検証内での精度についてを比較した。

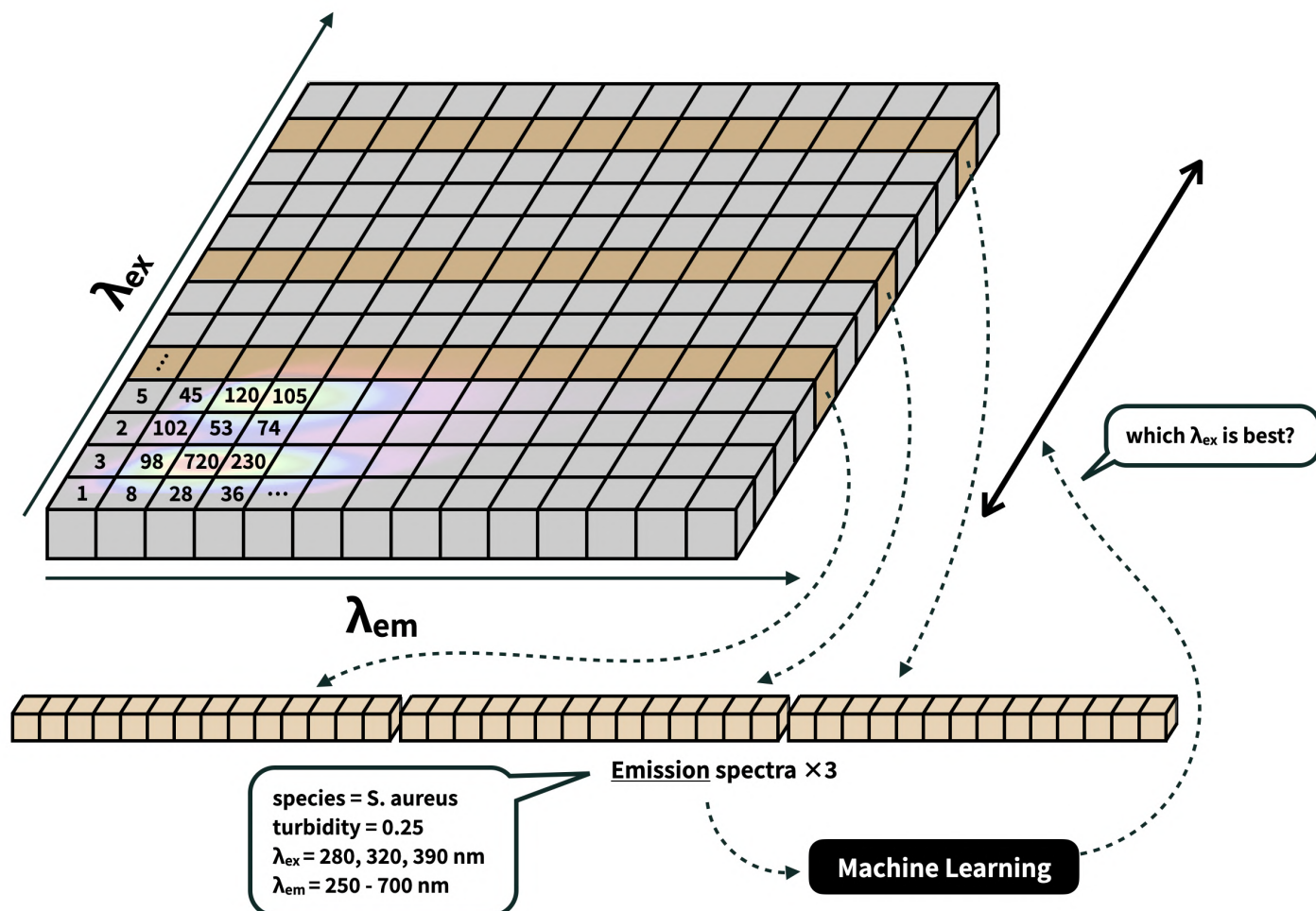


図3-17 3波長の励起光による蛍光スペクトルを使った機械学習のイメージ

例として*S. aureus*の濁度0.25のEEMから280 nm、320 nm、390 nmの励起光による蛍光スペクトルを抽出し、機械学習する場合のイメージ。

3つの励起波長による蛍光スペクトルを学習に用いた場合の診断精度の、波長組み合わせごとのxyz空間における分布を図3-18に、それを各座標平面に投射した場合の分布を図3-19に示す。それぞれのアルゴリズムは異なる学習特性を持ち、精度分布に独自の特徴を示す部分もあるが、いずれのモデルにおいても3次元空間分布では左下の空間領域に、投射した平面分布では250 nmから300 nmの領域の波長の組み合わせにおいて高い診断精度を達成する領域が形成されていることがわかった。一方でLogistic Regression CVやMLP Classifierでの320 nmから380 nmの領域のように、モデルによっては診断精度の低い領域が生じていることも明らかとなった。

個別のアルゴリズムを見てみると、Extra Trees Classifierは、全体的に精度の高い領域が広いことが分かった。精度の分布は比較的滑らかで、全体的なロバスト性が高い。これにより、幅広い波長条件で高い診断性能を発揮できる分類器として位置付けられる。Logistic Regression CVは3波長を使う場合、3つのモデルの中で最適な波長を選択できれば最も高い診断精度となることが可能である。一方で320 nmから380 nm領域のデータを用いる場合には逆に極端に性能が低下する。MLP Classifierも概ね広い範囲で高い精度を維持できる点や一部の領域で逆に性能が低下する点がLogistic Regression CVと類似の傾向を示している。1波長の場合、2波長の場合と同様に、学習データの偏りに対して敏感である可能性が示唆される。

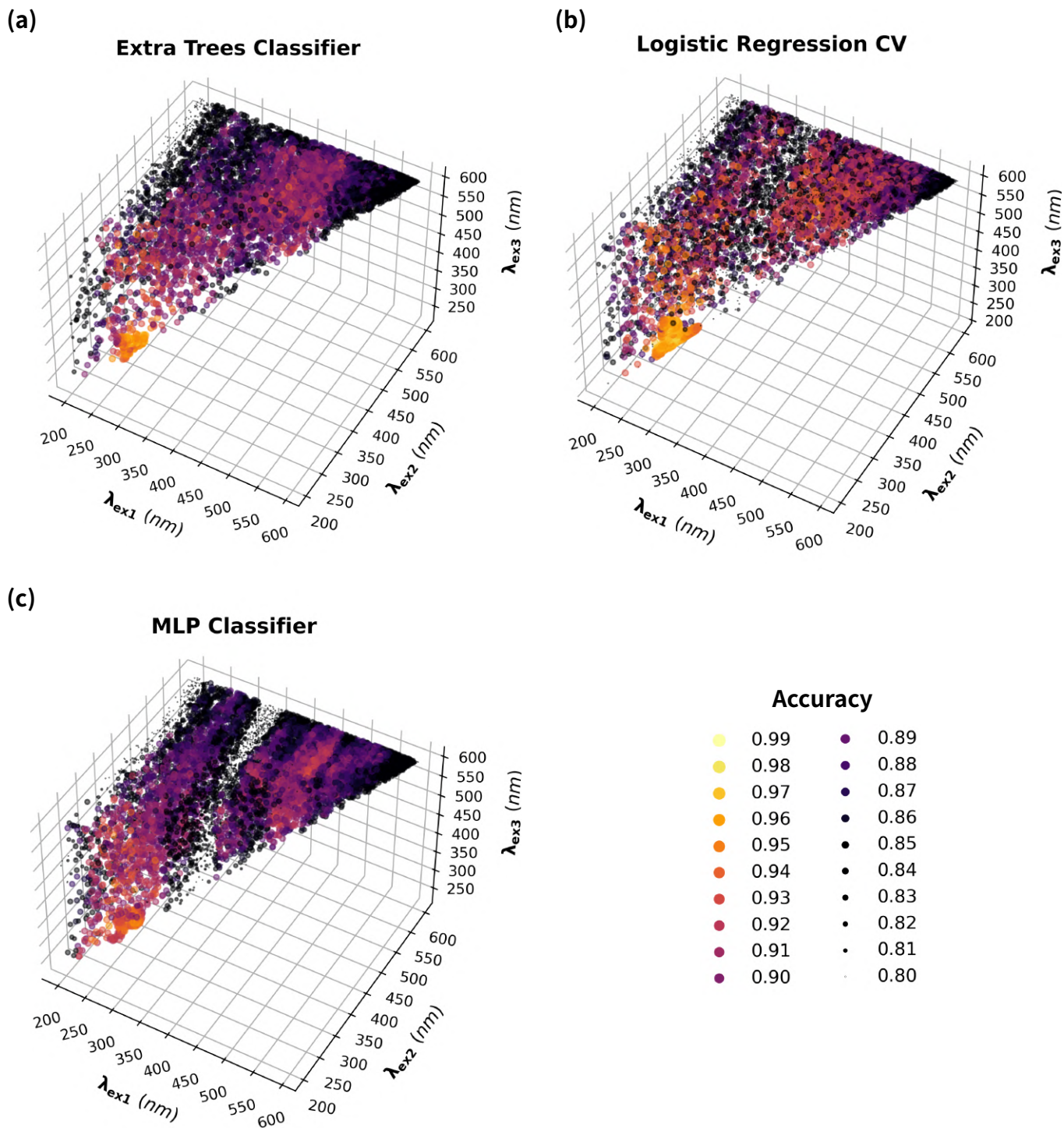


図3-18 3つの励起波長組み合わせごとの診断精度の空間分布

3つの励起波長による蛍光スペクトルを学習に用いた場合の診断精度の、波長組み合わせごとのxyz空間における分布。x軸は1つめの励起波長、y軸は2つめの励起波長、z軸は3つめの励起波長を表す。点のカラーマップと大きさはいずれも各試行内で交差検証による最適化を経た最終診断精度の、10試行回数の平均値を表し、明るいほど精度が良いことを表す。全てのグラフの可視性を向上させるために制度に対するカラーマップの中心値と点の大きさに傾斜をつけている点、および $\lambda_{ex1} < \lambda_{ex2} < \lambda_{ex3}$ の条件によってプロットは空間内で左上1/6の領域に限定されている点に注意。

いずれのモデルにおいても、グラフ内の左下の領域で、特定の波長の組み合わせにおいて高い診断精度を達成する領域が形成されていることがわかる（図3-19も参照）。またモデルによって場所が異なるが診断精度の低い領域も一部生じている。

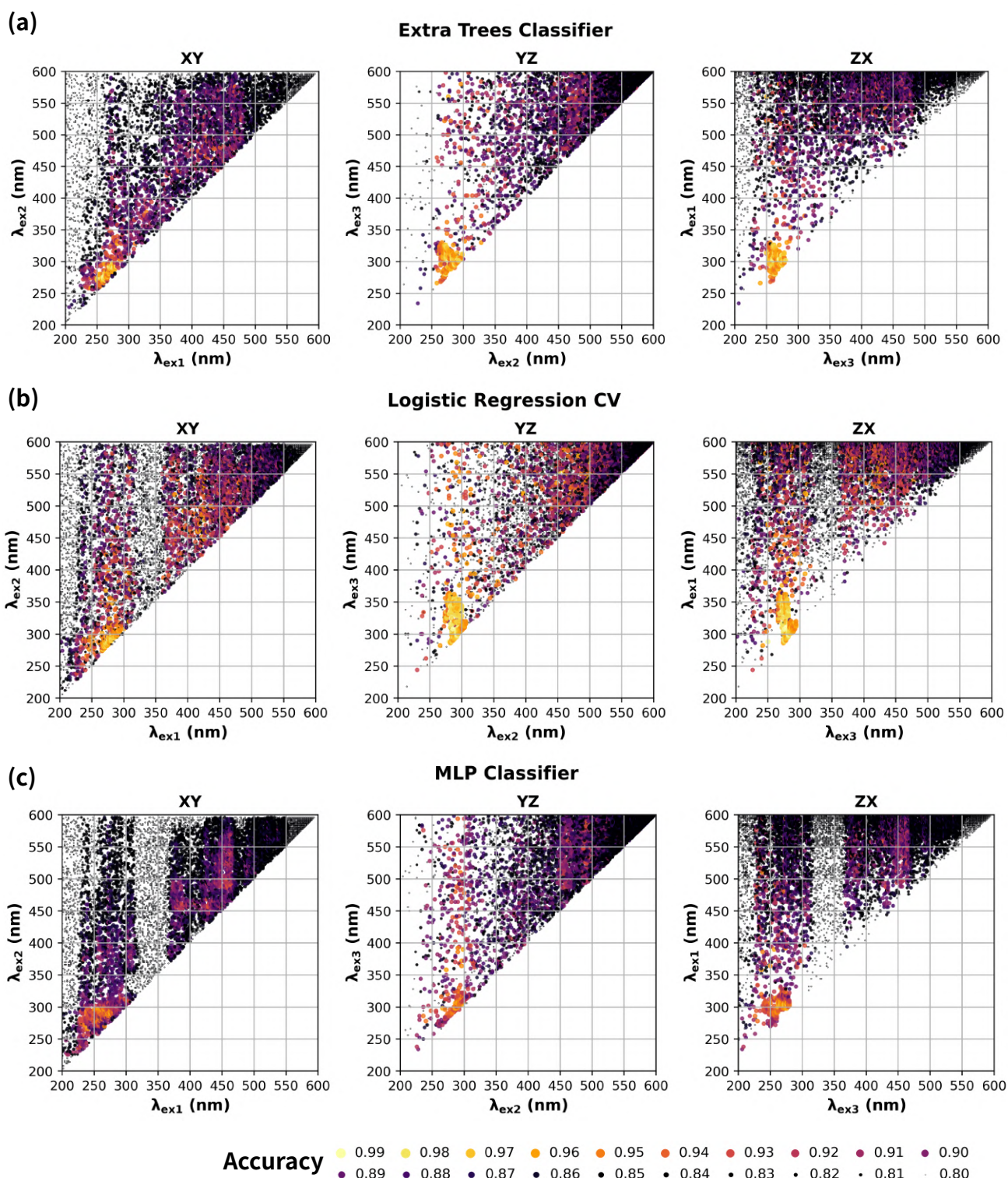


図3-19 3つの励起波長組み合わせごとの診断精度の平面分布

図3-18で表される空間分布を各座標平面に投射した場合の分布。各軸は1つめ、2つめ、3つめの励起波長を表す。点のカラーマップと大きさはいずれも各試行内で交差検証による最適化を経た最終診断精度の、10試行回数の平均値を表し、明るいほど精度が良いことを表す。全てのグラフの可視性を向上させるために制度に対するカラーマップの中心値と点の大きさに傾斜をつけている点、および各 $\lambda_{ex1} < \lambda_{ex2} < \lambda_{ex3}$ の条件件によってプロットは座標平面内で左上の領域に限定されている点に注意。

投射した平面分布では250 nmから300 nmの領域の波長の組み合わせにおいて高い診断精度を達成する領域が形成されている。また一方でLogistic Regression CVやMLP Classifierでの320 nmから380 nmの領域のように、モデルによっては診断精度の低い領域も生じている。

3.3.4. 4波長以上のスペクトルを用いた場合の診断精度について

さらに抽出する波長を4波長以上に増やしていった場合の診断精度の変化についても評価し、どの程度の波長数を学習データに含めれば全EEMデータを使った場合と統計学的に有意差のない診断精度が得られるのかという点について検討した。計算資源の制約により、4波長以上の場合に総当りで全励起波長組み合わせを試行することが困難であったため、ハイパーパラメーターの最適化に用いたベイズ最適化の手法を、診断精度の高い励起波長の組み合わせの最適化にも利用した。全励起波長による蛍光スペクトルデータを含む元来のEEMデータセットから、任意の数の励起波長による蛍光スペクトルを抽出し軸方向に結合して1次元化した新たなデータセットを作成した（図3-20）。計算資源の節約のためにテストデータによる評価を省略し、交差検証内での精度を最大化するようなハイパーパラメーターおよび励起波長の組み合わせについての最適化を1000回行い、最終的に最良の診断精度を出すハイパーパラメーターと波長組み合わせを使った交差検証データでの評価の平均値を算出する試行を、それぞれ独立に10回ずつ行わせアルゴリズム毎に比較した。3波長以下の場合との比較を公平にするために、3.3.1.から3.3.3.までに行った全組み合わせの仲での最良診断精度の結果ではなく、1励起波長から10励起波長までをこの学習・評価フローで計算した。

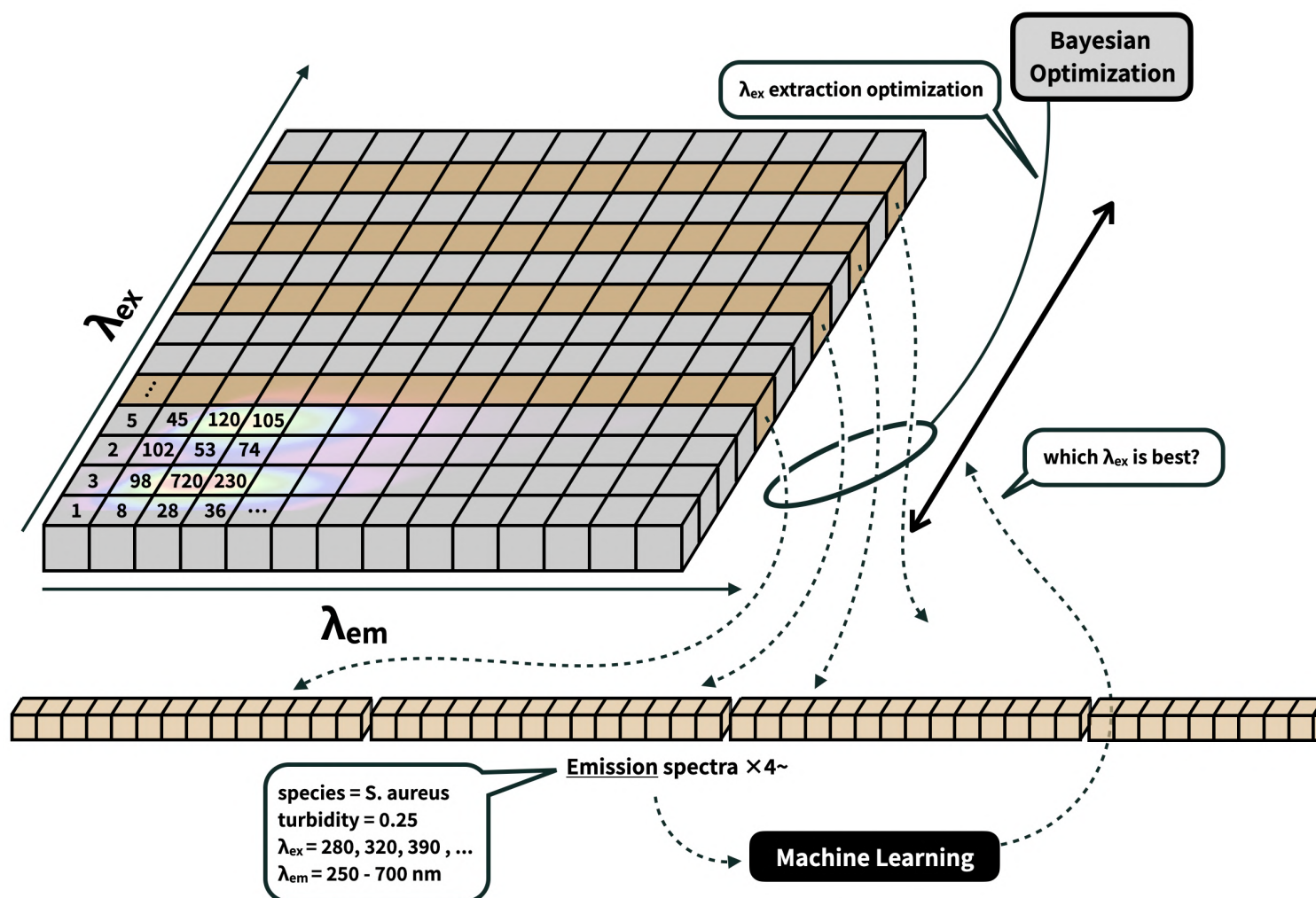


図3-20 4波長以上の励起光による蛍光スペクトルを使った機械学習のイメージ

例として *S. aureus* の濁度0.25のEEMからベイズ最適化によって選択した4波長の励起光による蛍光スペクトルを抽出し、機械学習する場合のイメージ。

データセットから抽出する励起波長の個数と、それを使って学習および診断した場合の精度の関係を示す(図3-21)。全体として、励起波長数の増加に伴っていずれのモデルにおいても診断精度が向上し、一定数を超えると精度が安定する傾向があることが明らかとなった。この傾向は励起波長の個数の増加により診断のためのデータの情報量が増大し、モデルの診断能力が向上するためであると考えられる。特に使用する波長の個数が3個を超えると診断精度の向上が緩やかになることがわかった。効率的な波長を選択することで最小限の励起波長の個数で高精度な診断を実現でき、その個数は今回の実験系における菌株数とサンプル数の場合においては数個で問題ないことを示していると考えられる。また、すべてのアルゴリズムにおいて、波長数が少ない場合には精度のばらつきが大きい、波長数が増加することで安定性が向上することも明らかとなった。この観察は、複数の波長を組み合わせることでノイズや外れ値の影響が軽減されるためであると考えられる。また前述のように3個以下と4個以上の比較を公正にするために、3個以下の場合の波長組み合わせの最良診断精度も、総当たりではなくベイズ最適化による算出の結果を使用している点について、3.3.1、3.3.2、3.3.3で算出した総当たりの場合の結果と比較しても同等の精度となっていることも確認できた。

個別のアルゴリズムを見てみると、Extra Trees ClassifierとLogistic Regression CVはほとんど同じような精度分布の変化となった。励起波長数が2個以上の場合に診断精度は平均値、中央値ともに96から97%に達した。一方でこれらと比較してMLP Classifierでは個数ごとの診断精度の分散がやや大きく、前節までの結果と同様にデータセットにおけるデータの偏りに学習モデルが影響されることが示唆された結果となった。

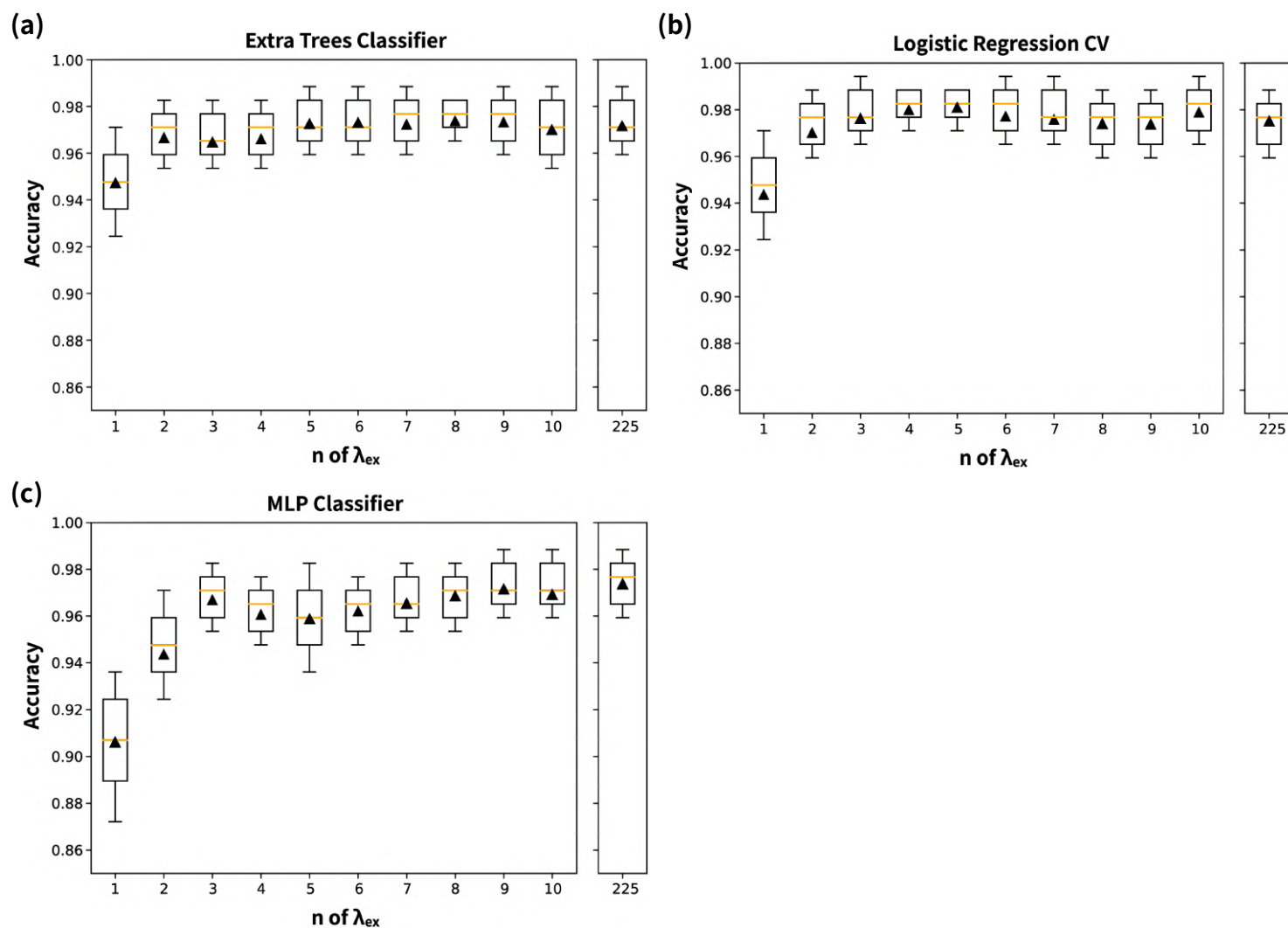


図3-21 励起波長の組み合わせ個数による診断精度の変化

学習および診断に使用する励起波長の個数と診断精度の関係を表す箱ひげ図。縦軸は診断精度、横軸は励起波長の組み合わせ個数を示す。箱はそれぞれの組み合わせ個数におけるハイパーパラメータと波長組み合わせについて1000回の最適化を行った後に、交差検証データを用いて平均の診断精度を算出する試行を10回行った結果の分布を、△は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を示す。

励起波長数の増加に伴って全てのモデルで診断精度が向上する傾向があることがわかる。特に使用波長数がおよそ3個を超えると診断精度の向上が緩やかになっている。また波長数が少ない場合には精度のばらつきが大きい。波長数が増加すると精度の分散が低下している。

3個以下の場合の精度の中央値、平均値は、**3.3.1.**、**3.3.2.**、**3.3.3.**で算出した総当たりの場合の結果と比較しても同等の精度となっている。

(a) Extra Trees Classifierの場合。励起波長数が2個以上の場合に診断精度は平均値、中央値ともに96から97%に達している。

(b) Logistic Regression CVの場合。Extra Trees Classifierの場合とはほとんど同じような精度分布の変化であった。(c) MLP Classifierの場合。個数ごとの診断精度の分散がやや大きい。

3.4. 波長幅の診断精度への影響

前節では励起波長別の診断精度の変化について検証したが、本節ではその励起光および蛍光の分光幅を可変させ、一定の波長幅を有するとした場合の診断精度の変化について検討を行った。まず、励起光のバンド幅変化がスペクトル形状に及ぼす影響を信号積算によるシミュレーションで解析し、その再現性および科学的妥当性を確認した（3.4.1）。次に、合成蛍光スペクトルの波長領域とその個数が診断精度に与える関係性を評価し、積算処理が診断精度に及ぼす影響を明らかにした（3.4.2）。さらに、合成励起スペクトルについても同様の解析を実施し、蛍光波長を固定した場合の波長領域とその個数が診断精度に及ぼす効果を考察した（3.4.3）。

3.4.1. 励起光バンド幅の変化によるスペクトル形状の変化と、積算のシミュレーション

本実験系で使用した蛍光分光光度計は照射する励起光の波長幅をバンド幅として2.5 nmから20 nmまで設定が可能であったが、2.3.1.で詳述したように本実験系においては、各菌株サンプルの濃度に対応できるダイナミックレンジとスループットを考慮して5 nm幅で計測を行っている。本節ではまず最初に、この5 nmバンド幅のEEMデータを利用して、より励起波長幅の広いEEMデータを再現することが可能であるかについて検討した。EEMデータから任意の連続した区間の励起波長による蛍光スペクトルを抽出し、蛍光波長ごとに積算したものを示す（図3-22の破線）。

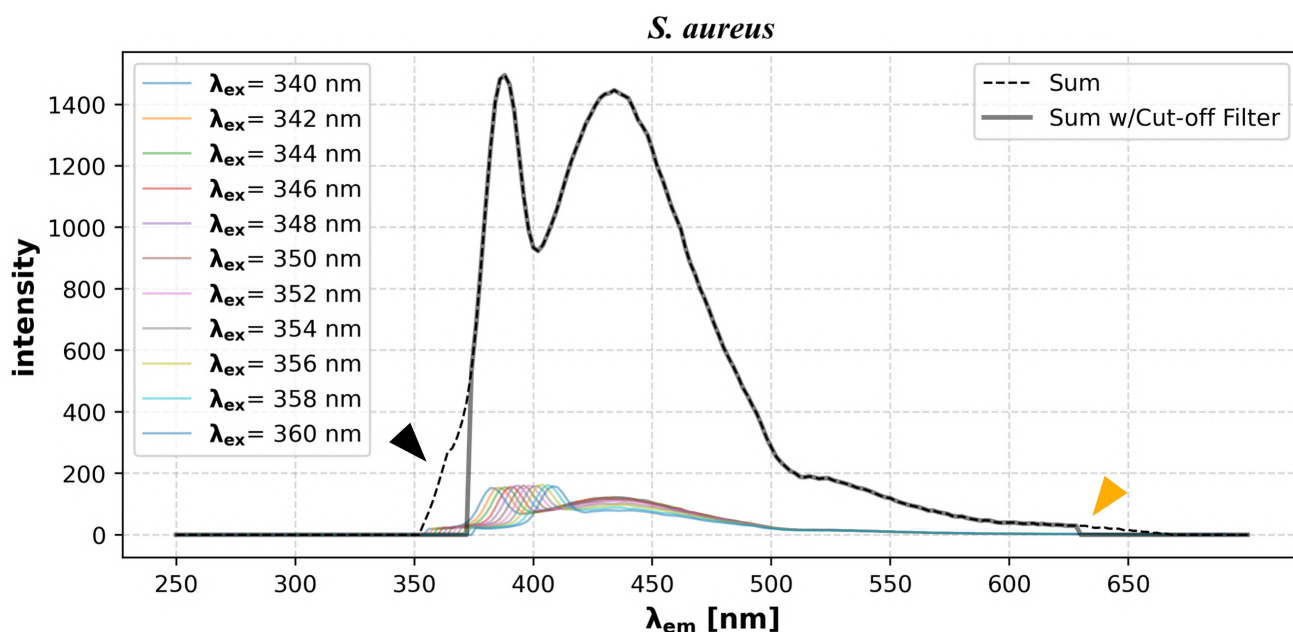


図3-22 個別の蛍光スペクトルと、それらの積算値の比較

*S. aureus*の濁度0.25のEEMデータから340から360 nmまでの励起波長による蛍光スペクトルを抽出し、それらを蛍光波長ごとに積算したものの。縦軸は正規化されていない信号値、横軸は蛍光波長、色の付いた線は各励起波長による蛍光スペクトル、破線はそれらの積算値、実線は破線に対してカットオフフィルターを適用したもの。黒▲はハイパスフィルター、黄▲はローパスフィルターによって積算値を0で上書きした部分。

蛍光分光光度計での計測時には、さらに励起光のレイリー散乱以下の波長と、その二次回折光以上の波長を30 nmのオフセットを付けて機械的なハイパスフィルターおよびローパスフィルターを通してカットオフしている（図3-23）。信号値を積算して励起波長のバンド幅を広げた励起光による蛍光スペクトルを再現する場合、単純に積算したのみでは、このカットオフフィルターによって本来なら計測できないはずの信号値が含まれてしまっている。したがってこの積算値によって得られた蛍光スペクトルから、含まれる励起波長のうち最も長波長側のものに対して+10 nmのオフセットを付けたハイパスフィルターと、最も短波長側のものの倍の波長に対して-10 nmのオフセットを付けたローパスフィルターを適用した（図3-22の実線）。

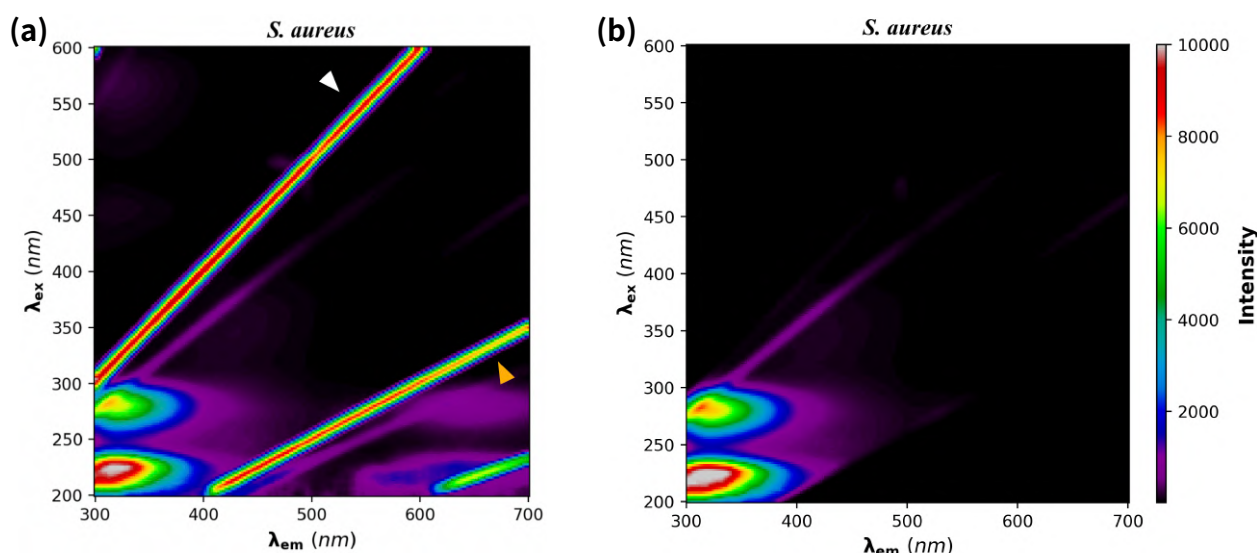


図3-23 カットオフフィルター適用前後のEEMの比較

(a) カットオフフィルターを適用前の*S. aureus*の濁度0.2のEEMおよび (c) 適用後の*S. aureus*の濁度0.25EEMの全体像の比較。

カットオフフィルターによって励起光によるレイリー散乱（白△）とその二次回折光（黄△）が取り除かれていることがわかる。

これらの処理を施した合成蛍光スペクトル、積算処理をしていない個別の蛍光スペクトル、さらに2.3.1.の予備実験で測定したバンド幅の広い励起光を用いた実測蛍光スペクトルの比較を図3-24に示す。励起光のバンド幅が異なる条件下で蛍光スペクトルを比較した結果、水分子のOH伸縮振動（3400 cm^{-1} ）に由来するラマン散乱のピーク位置は、いずれの場合も同一の波長で観測された。一方で、励起光の波長幅が広い条件では、ラマン散乱ピークの形状が広がる傾向が見られた。この現象は、ラマン散乱が励起光の波長幅に強く依存することを示しており、ラマン散乱の発生原理と一致する。さらにラマン散乱に対する蛍光強度の相対比に違いが認められ、蛍光ピーク位置が長波長側へシフトする現象も観測された。このシフトは、ラマン散乱が励起光の波長に依存して発生する波長変化であるのに対し、蛍光が分子のエネルギー遷移に基づいて固定された波長で発生するという基本的な物理的特性の違いに起因するものと考えられる。

一方で、バンド幅の広い場合の実測スペクトルと積算処理およびフィルターカットオフ処理を適用した合成蛍光スペクトルを比較した場合、ラマン散乱ピークの位置と幅、蛍光ピークの位置と幅、およびラマン散乱と蛍光の強度比がいずれもほぼ一致する形状を示した。この結果は、これらの処理によって得られた合成スペクトルが実測データを比較的高い精度で再現している可能性を示唆している。ただし、積算処理による影響として、信号の動揺が低減される一方で、スペクトルの細部が消失する現象が確認された。この現象は、機械学習を用いた解析において、信号ピークの線幅が広がることによるスペクトルデータの解像度の低下が診断精度に対して不利に働く可能性があることを示す。

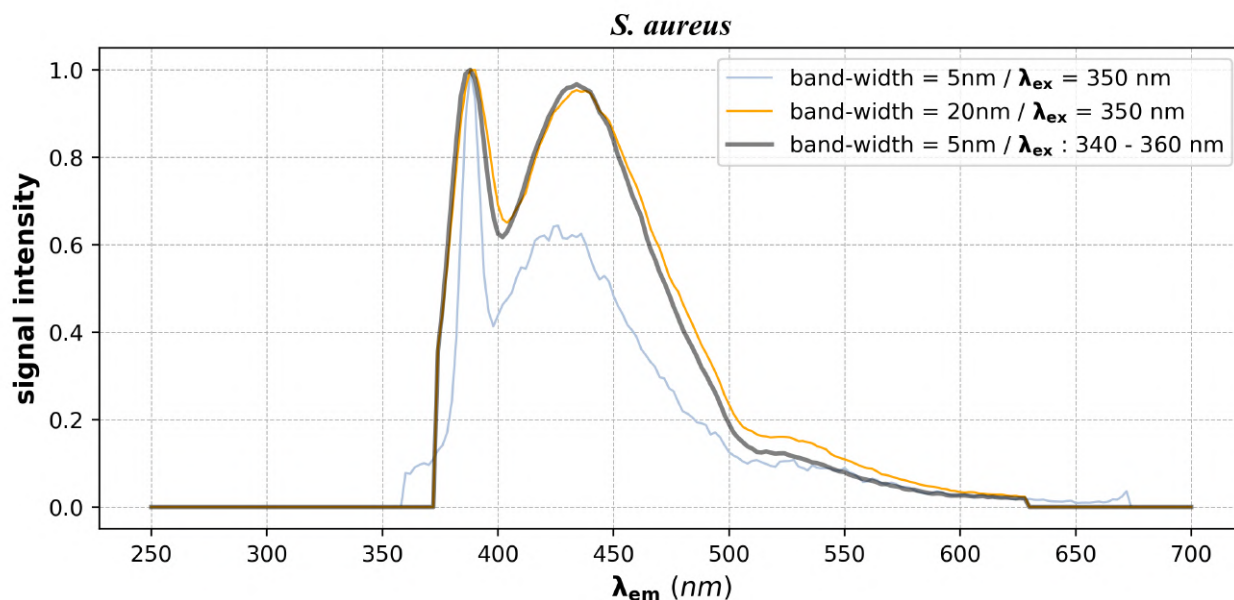


図3-24 励起光バンド幅が異なる蛍光スペクトルと、合成蛍光スペクトルの比較

実測の蛍光スペクトルと積算およびフィルターカットオフ処理を行った合成蛍光スペクトルを比較したもの。縦軸は正規化した信号値、横軸は蛍光波長。青線はバンド幅が5 nm時の励起光350 nmの蛍光スペクトル、黄線はバンド幅が20 nm時の励起光350 nmの蛍光スペクトル、黒線はバンド幅5 nm時の励起光340 nmから360 nmまでの2 nmごとの蛍光スペクトルを積算し、短波長側と長波長側にカットオフフィルターを適用したものを表す。図3-22と比較しスペクトル形状を比較するために、いずれも信号値を正規化している点に注意。

励起光のバンド幅が異なる蛍光スペクトルを比較した結果、水分子のラマン散乱のピーク位置は同一だが、励起光の波長幅に合わせてラマン散乱ピークの幅も変化している。またラマン散乱強度に対する蛍光強度の相対比に違いが見られる。また蛍光ピーク位置は長波長側へシフトしている。一方で、励起光バンド幅が広い場合の蛍光スペクトルと積算とフィルターカットオフ処理を適用した合成蛍光スペクトルを比較すると、ラマン散乱ピークの位置と幅、蛍光ピークの位置と幅、ラマン散乱と蛍光の強度比はいずれもほぼ形状が一致している。ただし積算処理の影響として、信号値の動揺が消失するとともに細かなスペクトルのディテールも同時に消失している。

3.4.2. 合成蛍光スペクトルの波長領域およびその個数と診断精度について

前節で信号値の積算による合成スペクトルのシミュレーションを、実測データと比較しても科学的な妥当性を持つて行うことができることを確認できた。次に、この積算処理を用いる場合の励起波長の波長幅、言い換えると積算開始励起波長と積算終了励起波長と、診断精度との関係性について検討した。

3.3.と同様の手順で全励起波長による蛍光スペクトルデータを含む元来のEEMデータセットから、任意の2つの励起波長によって規定される波長範囲の含まれる蛍光スペクトルを抽出し、それらに対して3.4.1.のような積算とカットオフ処理を行い、新たなデータセットを作成し、機械学習による評価を行った（図3-25）。

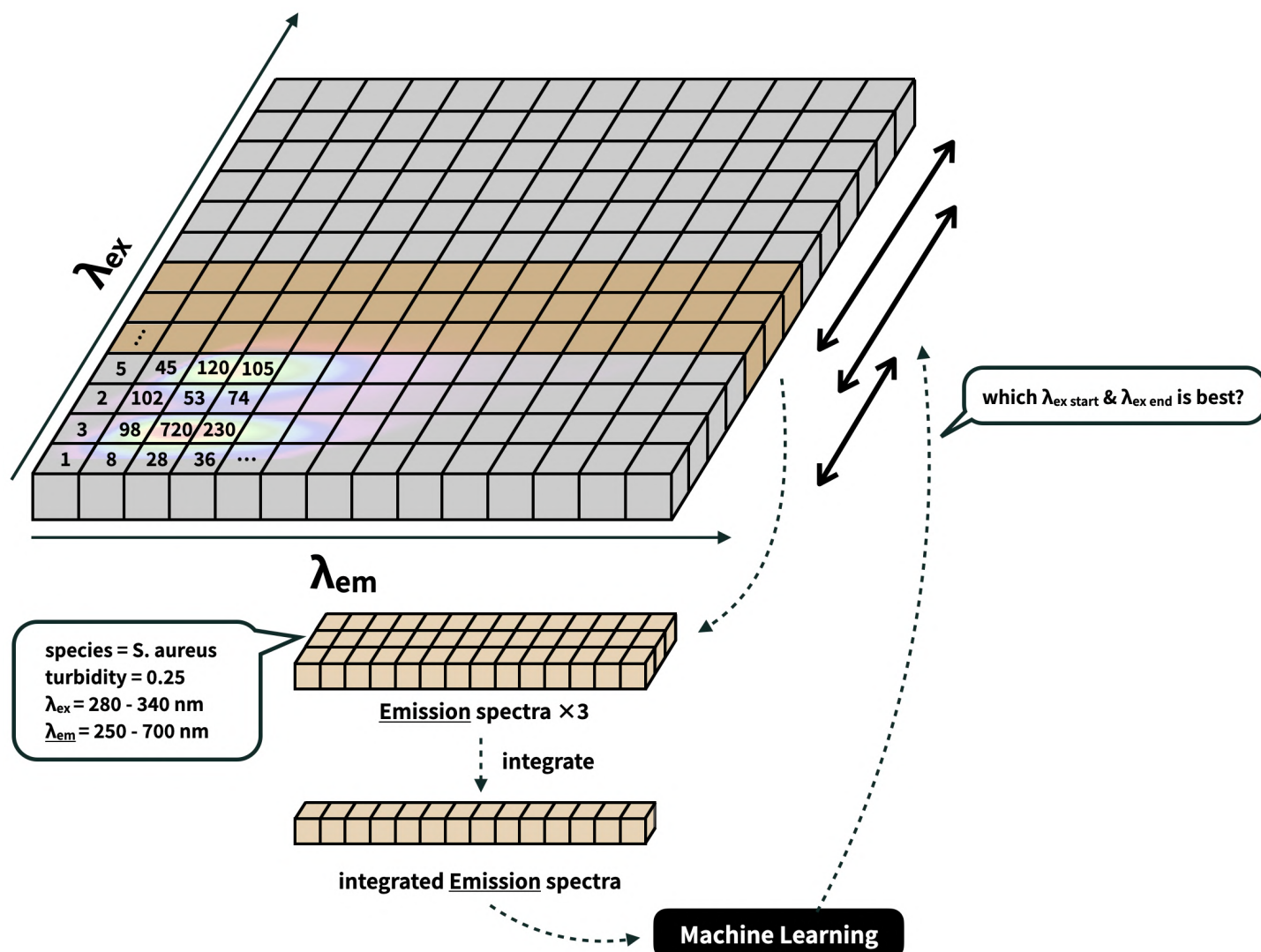


図3-25 積算した蛍光スペクトルデータを使った機械学習のイメージ

例として *S. aureus* の濁度0.25のEEMで、280から340 nmまでの励起光による蛍光スペクトルを抽出し、それらを蛍光波長ごとに積算して機械学習する場合のイメージ。

3.3.の結果より、診断精度の波長特異性は3つのアルゴリズムで同様の傾向を示していること、また3つのアルゴリズムのうち、そのアルゴリズム内に元々交差検証の要素を含むLogistic Regression CVでは元データの分割パターンによる診断精度の変動が少ないことがわかった。以上から、計算資源の節約のため、以後の波長と診断精度の関係性を解析するにあたって、学習アルゴリズムにはLogistic Regression CVのみを用い、10分割の交差検証による診断精度の平均値を算出することとした。ベイズ最適化を用いて2つの励起波長を200から600 nmまでの間で変化させた場合の、交差検証における診断精度の平均値を最大化させるような最適化試行を1000回行って最適化過程における最良の診断精度のパラメーターと、その交差検証内での精度の平均値を最終的に算出し、これを10サイクル繰り返した。選択する積算開始と終了波長の組み合わせの個数と診断精度の関係、およびその分布を比較した。

励起光を積算する開始波長と終了波長およびその個数によって、学習モデルによる診断精度がどのように変化するかを図3-26に示す。まず単一の励起波長範囲を積算した場合では、200から280 nmの波長領域に90 %以上の診断精度となる積算波長範囲が集中していることがわかる（図3-26a）。これは図3-13で示した、幅の狭い場合の励起光による蛍光スペクトルを使った学習モデルの診断精度での結果と比較して、波長域も精度も同様であるものの、中心を240 nmに合わせ上下に2.5 nm幅の狭さとなるように分光された励起光ではなくとも、最大で200から280 nmまでの80 nm幅の励起光を照射して得られる蛍光スペクトルでも同じ診断精度が得られることを意味している。次に、2つの励起波長範囲からそれぞれ合成蛍光スペクトルを積算する場合、200から280 nmと400から480 nmの2つの波長領域で高い診断精度となる積算波長範囲が集中していることがわかる（図3-26b）。異なるサンプルの蛍光情報を内包したスペクトルデータの組み合わせにより、診断精度が向上したことが示唆される。単一の励起波長範囲の場合と同様に、幅の狭い場合の励起光による蛍光スペクトルを使った学習モデルの診断精度での結果と比較して同様の結果だが、励起光に幅が許容されることがわかる。最後に3つの励起波長範囲からそれぞれ合成蛍光スペクトルを積算する場合、220から300 nmと400から480 nmの波長領域に加え、さらに350から400 nmの波長領域で高い診断精度となる積算波長範囲が集中していることがわかる（図3-26c）。2つの場合と同様に、各波長領域が異なる情報を学習モデルに提供し、それらが相乗的に作用している可能性を示している。ただし、220から300 nmの波長領域に限れば、波長範囲の個数を増やした場合には単一の場合と比較して許容される中心波長は220から300 nmまでと上下に幅があるものの、積算開始波長から終了波長までの波長幅は狭い方が精度が高い結果となった。

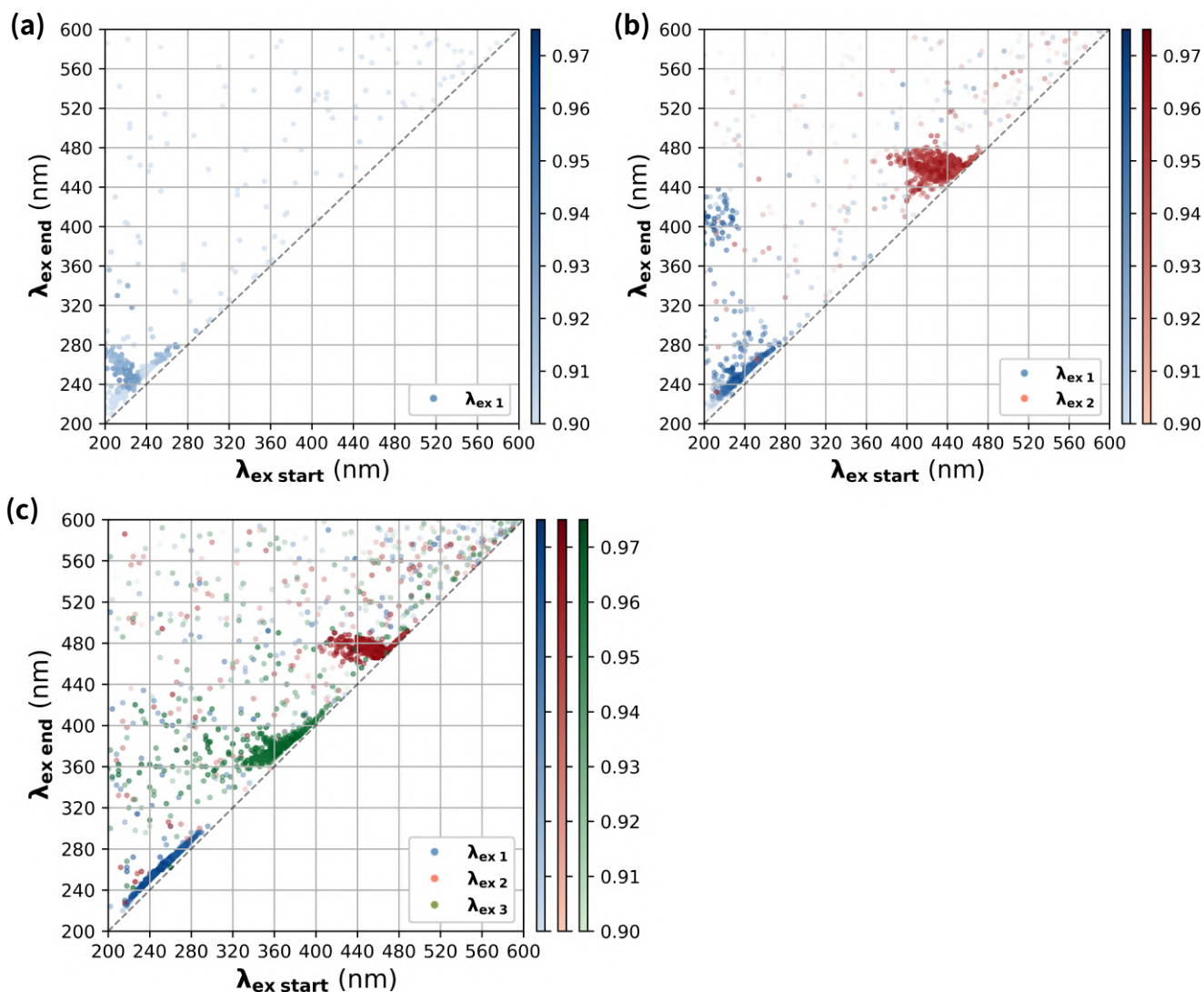


図3-26 積算する励起波長範囲による診断精度の変化

励起光を積算する開始波長と終了波長による診断精度の変化の、合成個数ごとの散布図。横軸は開始波長、縦軸は終了波長、色の種類は（波長の大小によって便宜的に分類した）合成系列、色の濃さは精度を表し、濃度が高いほど精度が高い。破線は $\lambda_{\text{ex start}} = \lambda_{\text{ex end}}$ を表す。 $\lambda_{\text{ex start}} < \lambda_{\text{ex end}}$ の条件によってプロットはグラフの左上半分に限定されていることに注意。破線からのy軸方向の距離が長いプロットほど、積算する波長範囲が広いことを示している。

(a) 1つの励起波長範囲のみを積算した合成蛍光スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

(b) 2つの励起波長範囲をそれぞれ積算した2つの合成蛍光スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

(c) 3つの励起波長範囲をそれぞれ積算した3つの合成蛍光スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

また学習および診断に使用する、積算する励起波長の個数と診断精度の関係を図3-27に示す。励起波長数の増加に伴って診断精度が向上していることがわかる。この傾向は積算する励起波長の個数の増加により診断のためのデータの情報量が増大しモデルの診断能力がより効果的に活用されるためであると考えられる。積算する励起波長数が10個の場合でも診断精度は緩やかに向上し続けているが、3個の時点で平均値は97 %を超え、4個の時点で中央値も97 %を超えている。また、波長数が少ない場合は精度のばらつきが大きく、波長数が増加すると精度の分散が低下する傾向も明らかとなった。

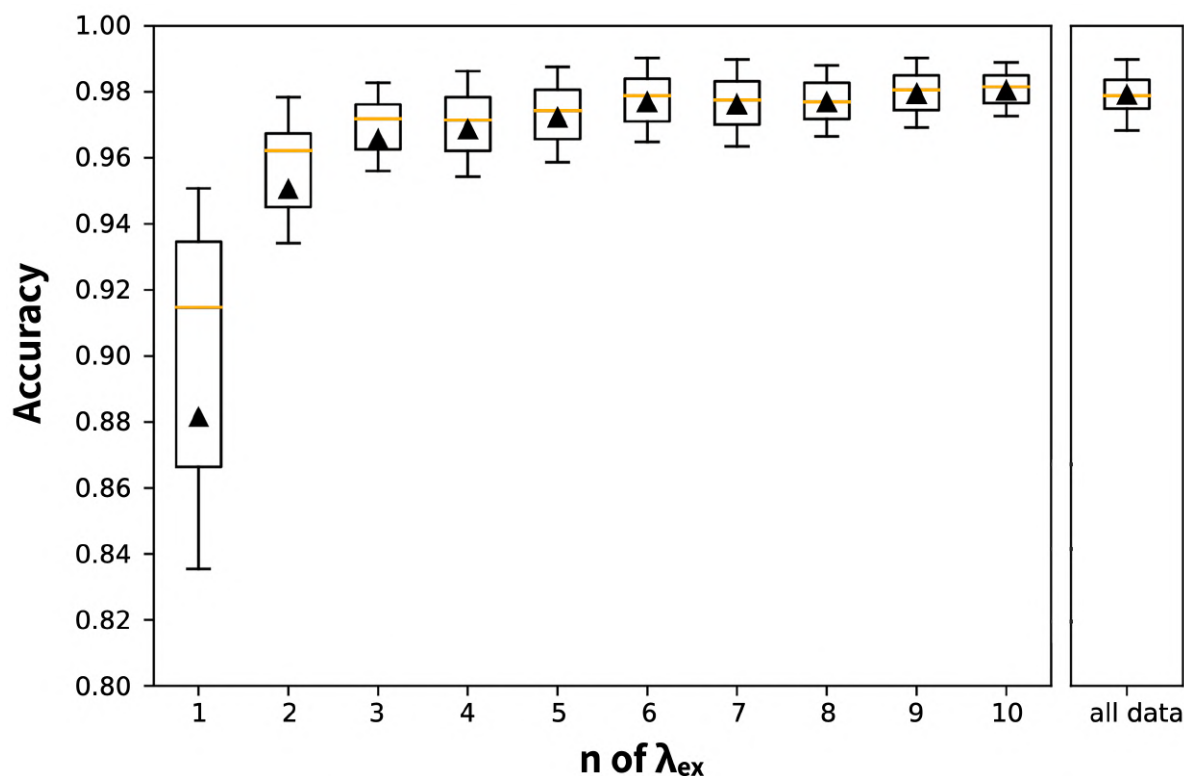


図3-27 積算する励起波長個数による診断精度の変化

学習および診断に使用する、積算する励起波長の個数と診断精度の関係を表す箱ひげ図。縦軸は診断精度、横軸は積算する励起波長の組み合わせの個数を表す。箱はそれぞれの組み合わせ個数におけるハイパーパラメーターと波長組み合わせについて1000回の最適化を行った後に、交差検証データを用いて平均の診断精度を算出する試行を10回行った結果の分布を、▲は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を示す。

積算する励起波長数の増加に伴って診断精度が向上する傾向があることがわかる。積算する励起波長数が3個以上の場合に平均値は97 %を超えている。波長数が少ない場合は精度のばらつきが大きく、波長数が増加すると精度の分散が低下している。

3.4.3. 合成励起スペクトルの波長領域およびその個数と診断精度について

蛍光分光法は本来、特定の波長の励起光を照射して生じる蛍光を分光器で波長分解してスペクトルを計測する計測手法であり、3.4.1.および3.4.2.ではこの励起波長幅を変化させた場合の蛍光スペクトルや診断精度について論じた。これに対し、測定の観点を変え、観測する蛍光波長を固定して励起光波長を短波長から長波長まで走査することで得られる励起スペクトルについて、特にその観測する蛍光波長に任意の波長幅をもたせた場合について検討した（図3-28）。

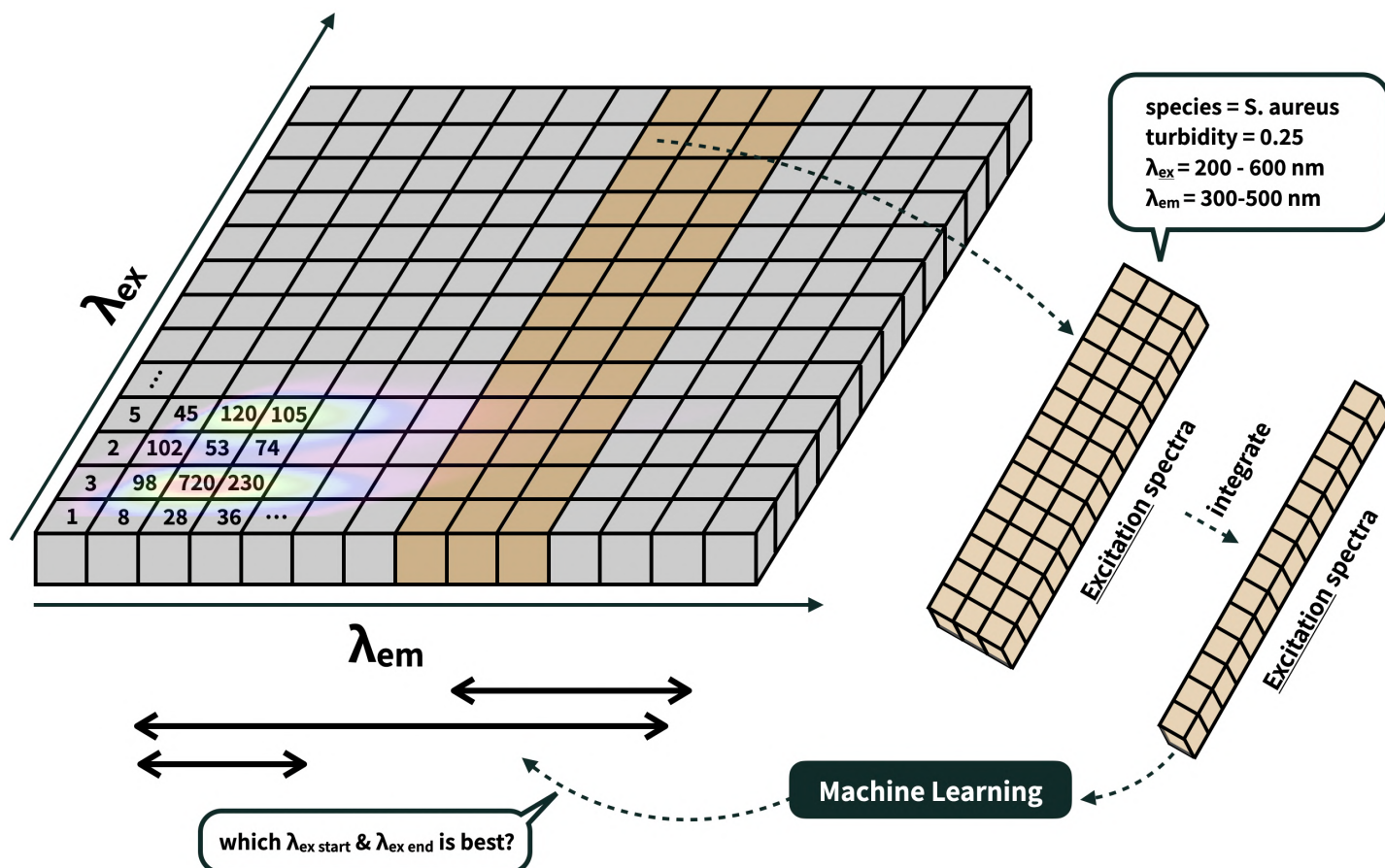


図3-28 積算した励起スペクトルデータを使った機械学習のイメージ

例として *S. aureus* の濁度0.25のEEMで、300から500 nmまでの励起光による蛍光スペクトルを抽出し、それらを励起波長ごとに積算して機械学習する場合のイメージ。

3.4.2.で行った波長の抽出をEEMの行と列を反転させて行った。ただし、3.4.1.で論じたハイパスおよびローパスフィルターとして、任意の蛍光波長範囲に含まれる励起スペクトルを単純に積算した後、含まれる蛍光波長のうち最も長波長側のものに対して+30 nmのオフセットを付けたハイパスフィルターと、最も短波長側のものに対して-30 nmのオフセットを付けたローパスフィルターを適用した。フィルターでカットオフした合成励起スペクトルを作成して新たなデータセットを作成し、機械学習による評価を行った。学習アルゴリズムにはLogistic Regression CVを用い、10分割の交差検証による診断精度の平均値を算出、ベイズ最適化を用いて2つの蛍光波長を250から700 nmまでの間で変化させた場合の、交差検証における診断精度の平均値を最大化させるような最適化試行を1000回行って最適化過程における最良の診断精度のパラメーターと、その交差検証内での精度の平均値を最終的に算出し、これを10サイクル繰り返した。選択する積算開始と終了波長の組み合わせの個数と診断精度の関係、およびその分布を比較した。

積算する蛍光の開始波長と終了波長およびその個数によって、学習モデルによる診断精度がどのように変化するかを図3-29に示す。単一の蛍光波長範囲を積算した場合では、励起波長の積算の場合と違い、550から650 nmの波長領域に90 %以上の診断精度となる積算波長範囲が集中していることがわかる（図

3-29a)。2つの蛍光波長範囲からそれぞれ合成蛍光スペクトルを積算する場合は、これに加えて370から600 nmの波長領域も合わせた2つの領域で高い診断精度となる積算波長範囲が集中していることがわかる（図3-29b）。3つの励起波長範囲からそれぞれ合成蛍光スペクトルを積算する場合、さらにこれらに加えて450から650 nmの広い波長領域に高い診断精度となる積算波長範囲が分散していることがわかる（図3-29c）。励起波長を積算する場合と比較して、1つ1つの積算開始波長から終了波長までの波長幅が広い方が精度が高い結果となった。

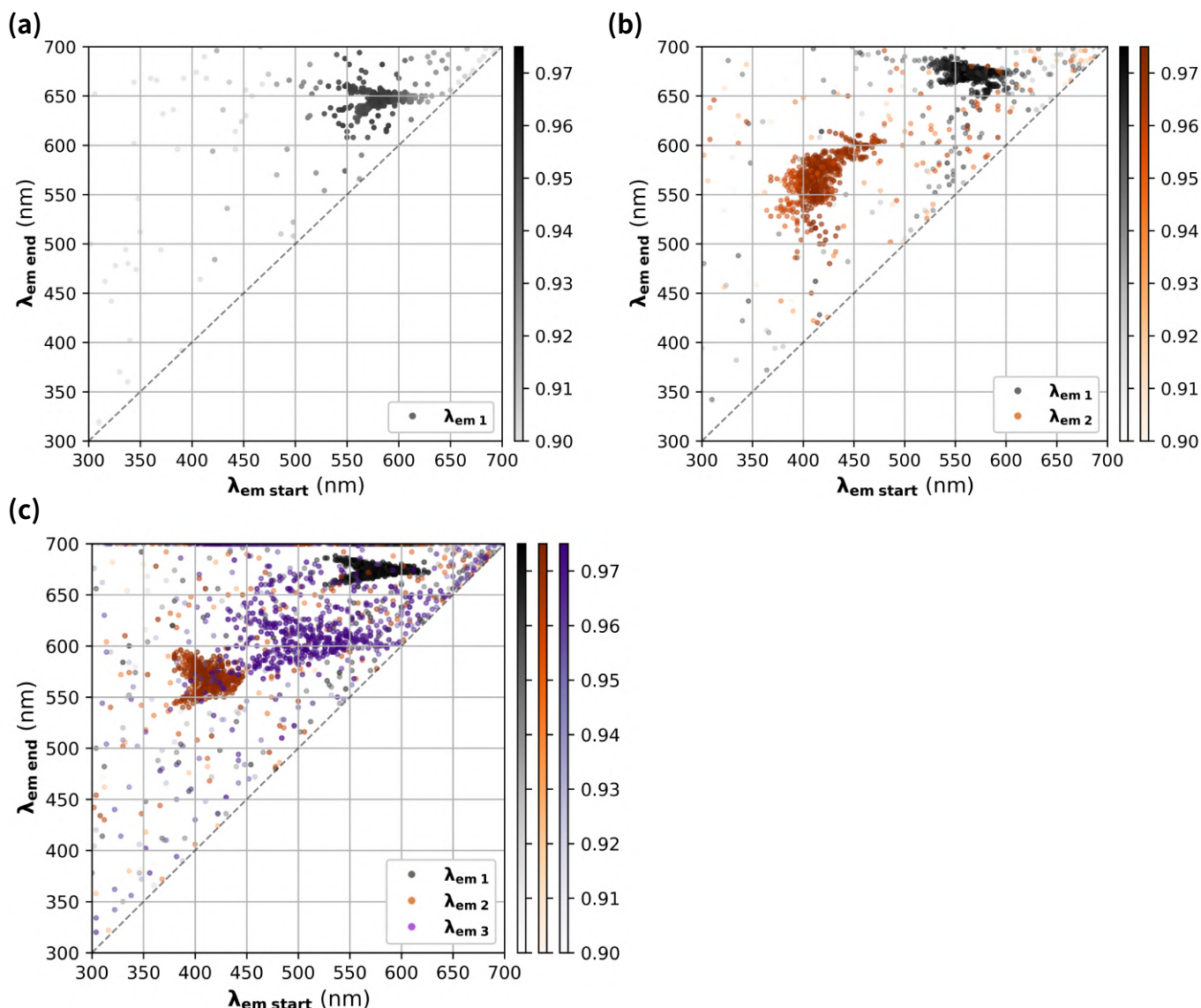


図3-29 積算する蛍光波長範囲による診断精度の変化

積算する蛍光の開始波長と終了波長による診断精度の変化の、合成個数ごとの散布図。横軸は開始波長、縦軸は終了波長、色の種類は（波長の大小によって便宜的に分類した）合成系列、色の濃さは精度を表し、濃度が高いほど精度が高い。破線は $\lambda_{em\ start} = \lambda_{em\ end}$ を表す。 $\lambda_{em\ start} < \lambda_{em\ end}$ の条件によってプロットはグラフの左上半分に限定されていることに注意。破線からのy軸方向の距離が長いプロットほど、積算する波長範囲が広いことを示している。

(a) 1つの蛍光波長範囲のみを積算した合成励起スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

(b) 2つの蛍光波長範囲をそれぞれ積算した2つの合成励起スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

(c) 3つの蛍光波長範囲をそれぞれ積算した3つの合成励起スペクトルを使った場合の波長と診断精度。

学習および診断に使用する、積算する蛍光波長の個数と診断精度の関係を図3-30に示す。励起波長の場合と同様に、積算する蛍光波長数の増加に伴って診断精度が向上していること、波長数が少ない場合は精度のばらつきが大きく、波長数が増加すると精度の分散が低下する傾向が明らかとなった。一方で励起波長の場合と異なる点として、蛍光波長数の増加に伴う診断精度の向上がより急激であり、2つの蛍光波長範囲を積算することで診断精度の平均値が97%以上に達している点が挙げられる。図3-29に示した各蛍光波長範囲ごとの診断精度の分布では、積算蛍光波長が三つ以上の場合、三つめのクラスが他のクラスに比べて広い波長領域に分散していることが観察されていたが、これは第一および第二の蛍光波長領域が菌株の診断に必要なスペクトル情報を提供している一方で、第三の波長領域に含まれる情報の重要性が低いためであり、その結果、第三の波長領域は全体の診断精度に大きな影響を与えないためだったのではないかと推測される。

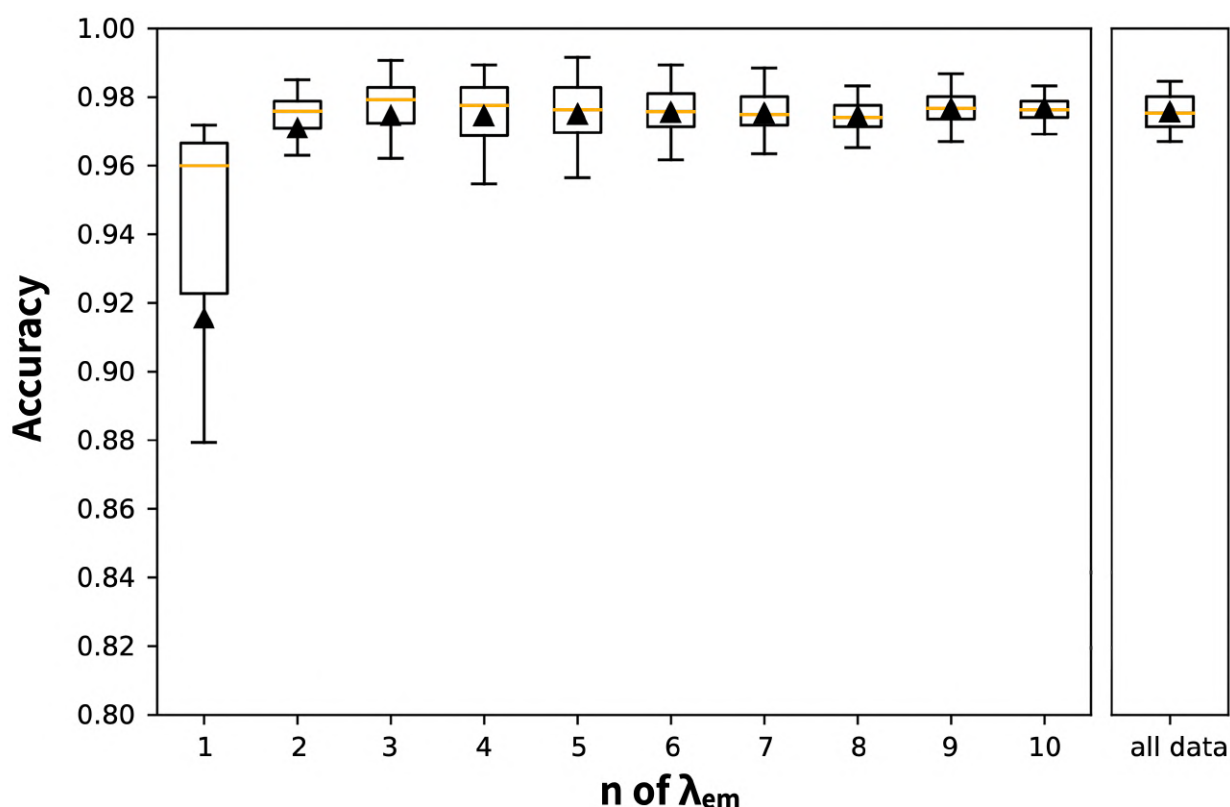


図3-30 積算する蛍光波長個数による診断精度の変化

学習および診断に使用する、積算する蛍光波長の個数と診断精度の関係を表す箱ひげ図。縦軸は診断精度、横軸は積算する蛍光波長の組み合わせの個数を表す。箱はそれぞれの組み合わせ個数におけるハイパーパラメーターと波長組み合わせについて1000回の最適化を行った後に、交差検証データを用いて平均の診断精度を算出する試行を10回行った結果の分布を、▲は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を示す。

積算する蛍光波長数の増加に伴って診断精度が向上する傾向があることがわかる。積算する蛍光波長数が2個以上の場合に平均値は97%を超えている。波長数が少ない場合に精度のばらつきが大きく、波長数が増加すると精度の分散が低下している。

3.5. まとめ

機械学習を用いた自家蛍光スペクトルデータによる細菌種同定の有効性について詳細に検討した。本章における目的は、従来の視覚的判断や主成分分析（PCA）では困難であった微細なスペクトル差異を捉え、迅速かつ高精度な細菌種同定を実現することであった。結果として、機械学習手法を導入することで、従来の手法では識別が難しかった菌種間の違いを効果的に識別できることが示された。

まず、データの前処理としてラベリング、標準化、PCAによる次元削減を実施し、機械学習に適したデータセットを構築した（3.2.1.）。この過程で、多重共線性の問題を軽減し、高次元データの持つ情報を効果的に抽出することが可能となった。機械学習モデルの選択においては、多数のアルゴリズムを比較検討し、その中からExtra Trees Classifier、Logistic Regression CV、MLP Classifierの3つを選定した（3.2.2.）。これらのモデルは、古典的手法ではあるが目的変数に対してサンプル数が少なく、かつ説明変数が多い今回のような場合には有効であることを確認できた。選定したモデルに対するトレーニングと評価方法として、交差検証とベイズ最適化を組み合わせた手法を構築し、モデルの汎化性能を高める工夫を行った（3.2.3.）。ハイパーパラメーターの最適化により、診断精度を向上させ、最終的に高精度な菌種同定モデルを構築することができた（3.2.4.）。特にLogistic Regression CVを用いたモデルが最も高い汎化性能を示し、テストデータに対しても安定した精度を達成した。

続いて励起・蛍光波長が診断精度へどのような影響を与えるのかについて検証するために、個別の波長による新たなデータセットを作成し学習と診断をさせ、その結果を比較することで、単一の励起波長によるスペクトルでも特定の波長領域で高い診断精度が得られることを確認した（3.3.1.）。1波長の場合には200から300 nmおよび460 nm付近の励起波長で高精度な分類が可能であった。また、2波長、3波長、そして4波長以上の組み合わせについても解析を行い、波長数の増加に伴って診断精度が向上する傾向があること、波長数が少ない場合でも高い診断精度が達成可能であることを明らかにした。これは菌種診断のための装置を開発するうえでの装置構成の簡略化とコスト削減に直結し、実用的な検査システムの設計において重要な知見となった。

さらにこの内容からもう一步踏み込み、波長幅の診断精度への影響についても検証した。励起光バンド幅の変化によるスペクトル形状の変化をシミュレーションし（3.4.1.）、信号積算による合成蛍光スペクトルの解析を行った。その結果、波長幅の調整が診断精度に大きく影響することが示され、波長幅が広い光源を用いた励起による高感度化が可能であることが明らかになった（3.4.2.）。さらに観測する視点を転換し、励起波長ではなく蛍光波長側を軸に励起スペクトルを積算し、同様に少数の波長領域で十分な診断精度が得られることがわかった（3.4.3.）。蛍光側の波長幅を広く取ることができるということはそれだけセンサー側に多くの光を取り込むことが可能ということであり、これにより、従来の蛍光分光光度計よりもさらに高感度な計測ができる可能性があることがわかった。

診断精度向上のための重要な特徴量、すなわち励起波長および蛍光波長の領域とその波長幅に関する知見を特定できたことにより、今後の装置設計において実際の応用を見据えて研究開発することが可能となった。特に、波長幅の広い光源を分光せずに使用する場合や、観測波長幅を広く取った検出系を用いた高感度化は、従来の単純な分光分析手法では難しいと考えられる微量な菌種の検出を最小の装置構成によって実現できる可能性がある。しかしこれらの結果にはいくつかの限界も存在する。使用した菌種とサンプル数が限られており、データの多様性や一般性については、菌株とサンプル数、サンプル濁度の分布を広げたさらなる検証が必要である。特に、同一菌種でも臨床現場で想定される異なる環境や条件下での変異を考慮すると、より多様なサンプルを用いたモデルの強化が求められる。また、測定条件の限界として、蛍光分光光度計の設定や使用した波長範囲に制約があり、全ての波長領域を十分にカバーできていない可能性がある。特に800 nm以上の長波長側のデータが不足しており、今後はより広範な波長範囲を含めた測定が望まれる。データのスパース性と機械学習モデルの限界も考慮すべきである。サンプル数が少ない中でモデルを最適化しているため、一部のモデルではデータセット内でのデータ分布に起因すると考えられる診断精度の揺らぎが観察されており、過学習や汎化性能の低下については今後も注意が必要である。

-
- ¹ Boulesteix AL, Sauerbrei W. Added predictive value of high-throughput molecular data to clinical data and its validation. *Brief Bioinform.* 2011 May;12(3):215-29.
- ² Guyon I, Nikravesh M, Gunn S, Zadeh LA, eds. *Feature Extraction: Foundations and Applications*. Vol 207. Springer Berlin Heidelberg; 2006.
- ³ Dietterich TG. Machine learning for sequential data: a review. In: Caelli T, Amin A, Duin RPW, de Ridder D, Kamel M, eds. *Structural, Syntactic, and Statistical Pattern Recognition*. Vol 2396. Springer Berlin Heidelberg; 2002:15-30.
- ⁴ Jordan MI, Mitchell TM. Machine learning: Trends, perspectives, and prospects. *Science*. 2015;349(6245):255-260. doi:10.1126/science.aaa8415.
- ⁵ Langley, Pat. "Machine learning as an experimental science." *Machine Learning* 3 (2004): 5-8.
- ⁶ Alpaydin, E. (2020). *Introduction to Machine Learning*. MIT Press.
- ⁷ Kwon O, Sim JM. Effects of data set features on the performances of classification algorithms. *Expert Systems with Applications*. 2013;40(5):1847-1857.
- ⁸ Scikit-learn. "Choosing the Right Estimator" : https://scikit-learn.org/stable/machine_learning_map.html (2024/11/18アクセス) .
- ⁹ Kotsiantis S, Kanellopoulos D, Pintelas P. Data preprocessing for supervised learning. *Int J Comput Sci Eng Inf Technol*. 2006;1(2):111-117.
- ¹⁰ Bergstra, James et al. "Algorithms for Hyper-Parameter Optimization." *Neural Information Processing Systems* (2011).
- ¹¹ Afnan MAM, Liu Y, Conitzer V, et al. Interpretable, not black-box, artificial intelligence should be used for embryo selection. *Hum Reprod Open*. 2021;2021(4).
- ¹² Bishop, C. M. (2006). *Pattern Recognition and Machine Learning*. Springer.
- ¹³ LeCun, Y., Bengio, Y., & Hinton, G. (2015). Deep learning. *Nature*, 521(7553), 436–444.
- ¹⁴ Schmidhuber, J. (2015). Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Networks*, 61, 85–117.
- ¹⁵ Goodfellow, I., Bengio, Y., & Courville, A. (2016). *Deep Learning*. MIT Press.
- ¹⁶ Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I., & Salakhutdinov, R. (2014). Dropout: A simple way to prevent neural networks from overfitting. *Journal of Machine Learning Research*, 15(1), 1929–1958.
- ¹⁷ Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32.
- ¹⁸ Xu, Xiangjun & Teng, Geer & Wang, Qianqian & Zhao, Zhifang & Wei, Kai & Bao, Mengyu & Zheng, Yongyue & Luo, Tianzhong. (2023). Spectral preprocessing combined with feature selection improve model robustness for plastics samples classification by LIBS. *Frontiers in Environmental Science*. 11. 10.3389/fenvs.2023.1175392.
- ¹⁹ Patterson, D., & Hennessy, J. L. (2013). *Computer Organization and Design: The Hardware/Software Interface*. Elsevier.
- ²⁰ Ribeiro MT, Singh S, Guestrin C. "Why should i trust you? ": explaining the predictions of any classifier. In: *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. ACM; 2016:1135-1144.
- ²¹ Kohavi, R. (1995). A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. *IJCAI*, 14(2), 1137–1145.

-
- ²² Snoek, J., Larochelle, H., & Adams, R. P. (2012). Practical Bayesian Optimization of Machine Learning Algorithms. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 25, 2951–2959.
- ²³ Rasmussen, C. E., & Williams, C. K. I. (2006). *Gaussian Processes for Machine Learning*. MIT Press.
- ²⁴ Steinruecken, Christian & Smith, Emma & Janz, David & Lloyd, James & Ghahramani, Zoubin. (2019). The Automatic Statistician. 10.1007/978-3-030-05318-5_9.
- ²⁵ Hutter, F., Hoos, H. H., & Leyton-Brown, K. (2011). Sequential model-based optimization for general algorithm configuration. *International Conference on Learning and Intelligent Optimization*, 507–523.
- ²⁶ Frazier, P.. “A Tutorial on Bayesian Optimization.” ArXiv abs/1807.02811 (2018).

4. 菌種の同定に最適化した計測装置の開発

本章ではここまで得られた理論的知見を基に、実際の菌種同定に適用可能な計測装置を開発する。最適な光源の選定および最適化（4.1）、光源と光学系の設計と製作（4.2）、および検出系の構築とその評価（4.3）について詳述する。これらのプロセスを通じて、実用化に向けた技術的課題を明らかにし、実験結果を踏まえて考察することで、理論と実践の橋渡しを図ることを目的とする。

4.1. 光源の選定と最適化

4.1.1. 試作用LEDの選定と、発光特性を反映した合成蛍光スペクトルのシミュレーション

前章までの解析結果から、LEDを分光せずに直接励起光源として用いる手法によって、菌種同定に要求される精度を確保し得る可能性が示された。現在、市販されている蛍光分光光度計は広い波長範囲と高い検出感度を備えているが、その多くは数百万円規模の価格帯にあり、また複雑な光学系や独自の調整手順によって計測時間や操作性の面で制約が生じる。なぜならこれらの市販の蛍光分光光度計は可変波長励起光源や高感度検出器を搭載するため、構造や制御が精密化し、据置き型であることが多く、特定目的の高速な現場分析には不適當である可能性が高いからである。

装置の光源候補としては、LED以外に白色連続光源や、レーザー光源、蛍光ランプ光源などが考えられる。白色連続光源も蛍光ランプ光源も高出力で広帯域な励起光を得ることが可能だが、分光器やフィルターによる波長抽出が不可欠であり、装置全体を複雑かつ高価にする要因となる。またレーザー光源は非常に狭帯域で高輝度な照射が可能である一方、発振波長の自由度が低く、ビーム整形や冷却など技術的制約とコスト増大を招き、多波長化が容易ではない。これに対しLEDは、相対的にロバストな駆動が可能で低コストな上、異なるピーク波長特性を有するLEDを複数組み合わせることにより、必要な波長領域を柔軟かつ容易にカバーできるため、菌種同定に十分な蛍光励起特性を有する計測系を効率的に構築し得ると考えられる。またLEDを用いることで高額な分光用光学系の一部を省略でき、かつ個別のLEDを複数組み合わせることで、励起波長の選択性を容易かつ迅速に確保できる意義があると考えられた。

これらの考察を踏まえ、本研究では量産時の部品調達性、出力特性、素子諸元取得の容易さ、そして前章で検討した励起波長範囲への適合性を判断基準とし、36種類のLEDを選定した（補遺8.3.1.参照）。続いて各LEDについて製造業者が公開している諸元表から発光スペクトルデータを収集し、波長特性の解析を行った。メーカーの諸元表には波長スペクトルのプロットが掲載されているが、数値データとしては提供されていない。そのため、各LEDの発光スペクトルについて、中心波長、ピーク波長、短波長側の半値全幅（FWHM: Full Width at Half Maximum）、長波長側のFWHMの4つのパラメーターをプロットから算出した。一般的なダブルガウシアンフィッティングに¹、ベースとなるガウス分布の長波長側と短波長側のFWHMを非対称にすることで、諸元表の発光スペクトルを効率的に再現することができた（図4-1a）。またこれらの選定した使用候補となる36種類のLEDは、200から600 nmの深紫外から可視光域までの広範な波長域を連続的にカバーしていることを確認できた（図4-1b）。

これらの選定したLED光源の波長特性を踏まえた上で、まずLEDのような波長幅の比較的広い光源を励起光源として用いた場合の合成蛍光スペクトルをシミュレーションした。例としてLED18（ $\lambda_{\text{peak}} = 365$ nm、 $\lambda_{\text{center}} = 375$ nm、 $\text{FWHM}_{\text{short}} = 8$ nm、 $\text{FWHM}_{\text{long}} = 10$ nm）を励起波長として用いた場合に、濁度0.25のS. aureusのサンプルから得られると考えられる理想的な合成蛍光スペクトルをシミュレーションする過程を図4-2に示す。図3-22で示した場合と同様に単純な蛍光スペクトルの積算結果にカットオフフィルターを適用した場合、合成蛍光スペクトルに対する各励起波長による蛍光スペクトルの寄与は均等である（図4-2のa）。これに対して、LEDの発光スペクトルによる励起波長ごとの強度に応じた各励起波長による蛍光スペクトルに重みを付けた場合（図4-2b）、合成蛍光スペクトルはピーク位置を含めてスペクトルの形状が大きく変化していることがわかる（図4-2c）。すなわち試作の計測装置にLED光源を用いる蛍光測定システムにおいては、光源の実際の発光特性を考慮した重み付け処理による再現が必要である可能性があることが明らかになった。さらには装置設計において選定するLED光源の波長特性が診断精度に直接的な影響を与える可能性があることが示唆された。

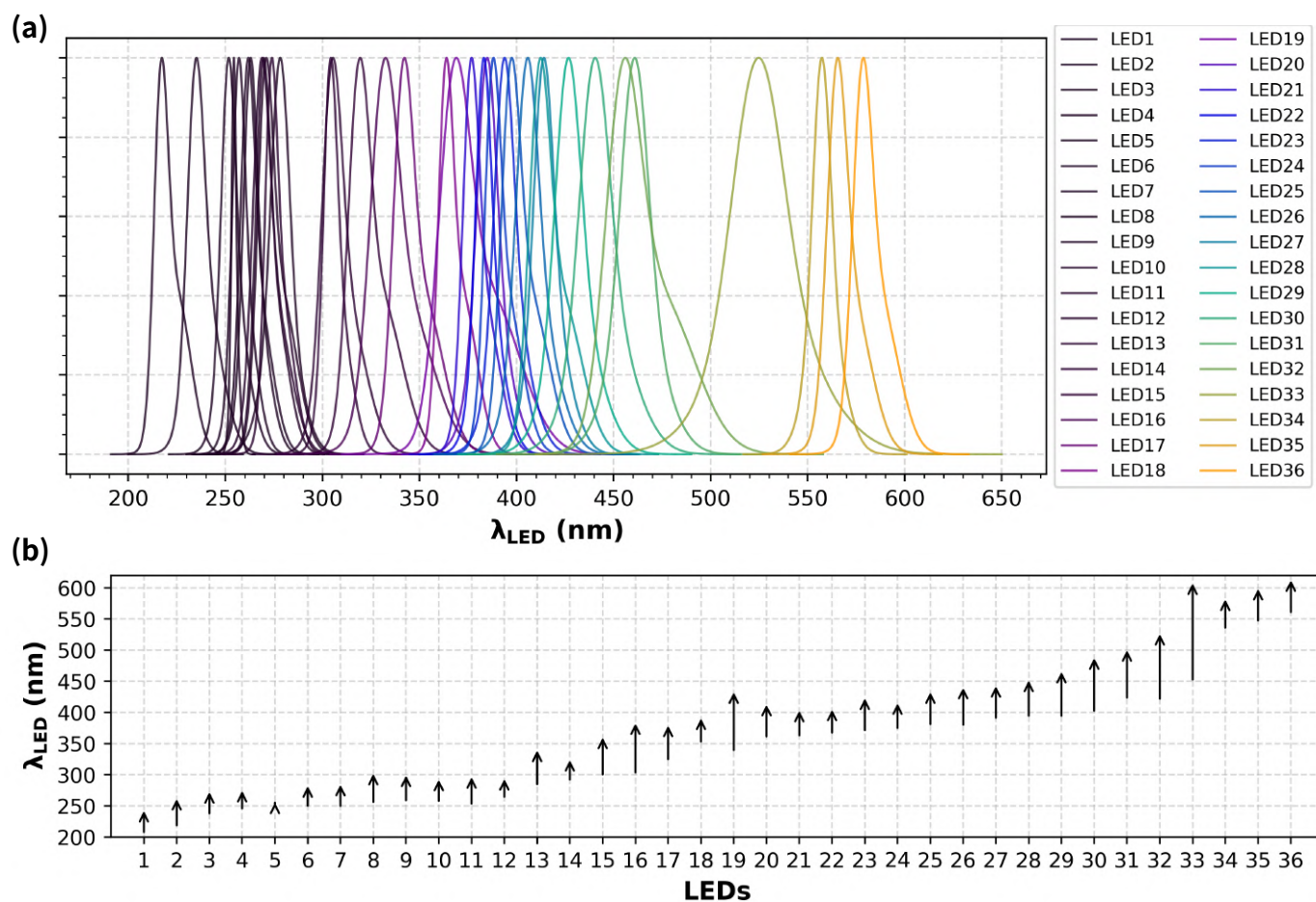


図4-1 LEDの発光スペクトル

市場にて入手可能な200から600 nmまでの単色LEDのうち、試作に使用する候補として検討したLED（8.3.1.参照）の発光スペクトルと分布。

(a) 各LEDのスペクトル。いずれも2つの中心のズレたガウス分布を重ねた非対称なスペクトルとなっている。縦軸は正規化された発光強度、横軸は発光波長。

(b) 各LEDの発光波長域の分布。縦軸は発光波長、横軸はLEDの番号を表す。200から600 nmの波長範囲を段階的にカバーしていることがわかる。

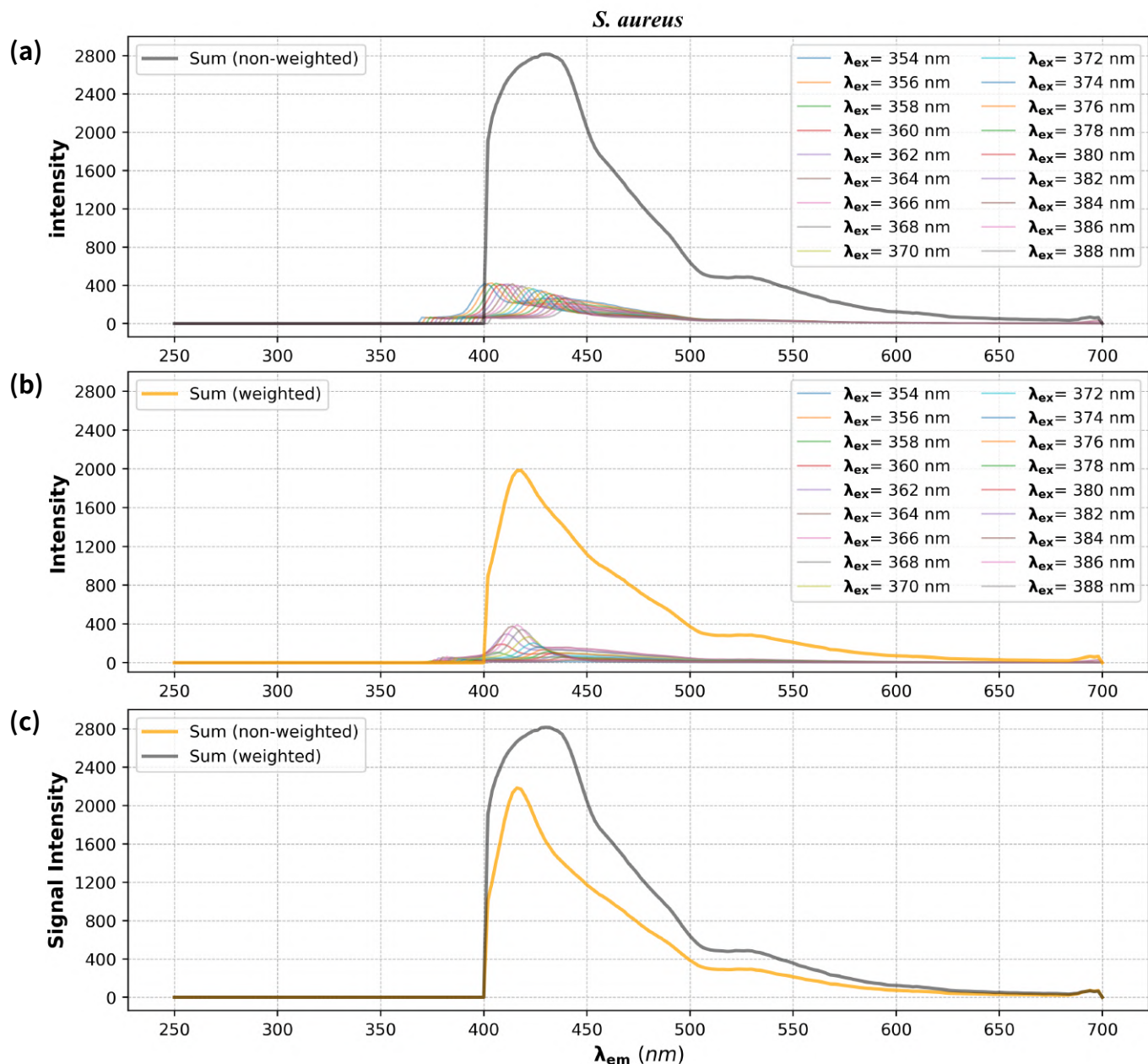


図4-2 LEDスペクトルの重み付けによる、合成蛍光スペクトルの変化

LED18 ($\lambda_{peak} = 365$ nm、 $\lambda_{center} = 375$ nm、 $FWHM_{short} = 8$ nm、 $FWHM_{long} = 10$ nm) を光源に使用した場合の、LEDの波長ごとの発光強度に起因する合成蛍光スペクトルの変化。縦軸は正規化されていない信号強度、横軸は蛍光波長を表す。

(a) 354から388 nmまでの全ての励起波長強度が等しい場合の合成蛍光スペクトル。

(b) LED18の発光スペクトル (図4-1a参照) による積算前の各蛍光スペクトルへの重み付けと、それらの積算による合成蛍光スペクトル

(c) aとbを比較したもの。

4.1.2. ベイズ最適化を使った計測装置用LEDの最適化

前節の結果を踏まえ、3.4.で求めた理想的な幅の広い波長光源ではなく、実装を視野に入れて市場で入手可能な光源を用いた場合の、菌種同定の精度を最大化する最適なLEDの組み合わせを探索した。前節で近似した各LEDの発光スペクトルによる重み付けを反映した合成蛍光スペクトルを用いて、LEDの波長と使用するLEDの個数を変数とし、診断精度を目的関数とするベイズ最適化を行った。

選定したLEDの組み合わせと診断精度との最適化過程における関係性をプロットしたものを図4-3に示す。単一のLEDを用いる場合（図4-3a）、使用するLEDによって診断精度は95 %から50 %まで分布のばらつきが大きいこと、精度は番号が12以下のLED、特に3以下の深紫外領域のLEDにおいて精度が高い傾向があることがわかる。一方、複数のLEDを組み合わせた場合（図4-3b-d）には精度が安定し、特に4つ以上のLEDを使用する場合には概ね高い精度を一貫して達成できることが明らかとなった。これは特定の波長のみを用いる場合には菌種間での蛍光特性の重なりやノイズの影響を受けやすいが、複数の波長を組み合わせることで情報の冗長性が増加し、診断の信頼性が向上することを示唆している。特に4つ以上のLEDを使用した場合ではほぼすべての組み合わせで高い精度が得られており、少なくとも4つのLEDを含む光源設計を行った場合に、十分な診断精度が得られると考えられた。

また最適化過程における使用LEDごとの精度分布ではなく、複数回の最適化の結論としての組み合わせを用いた交差検証プロセス内での分布を、使用LEDの数ごとの診断精度の変化を図4-4に示す。図4-3で示した結果と同様に、単一のLEDを使用した場合は精度のばらつきが大きいことが確認できた。特に、LEDの使用個数が4つ以上の場合には診断精度の上昇はほぼ0となり、使用個数の増加に対する精度やばらつきの改善が限定的であることが示唆された。このことから、やはり試作に必要なLEDの最適な個数は4個程度であると考えられた。

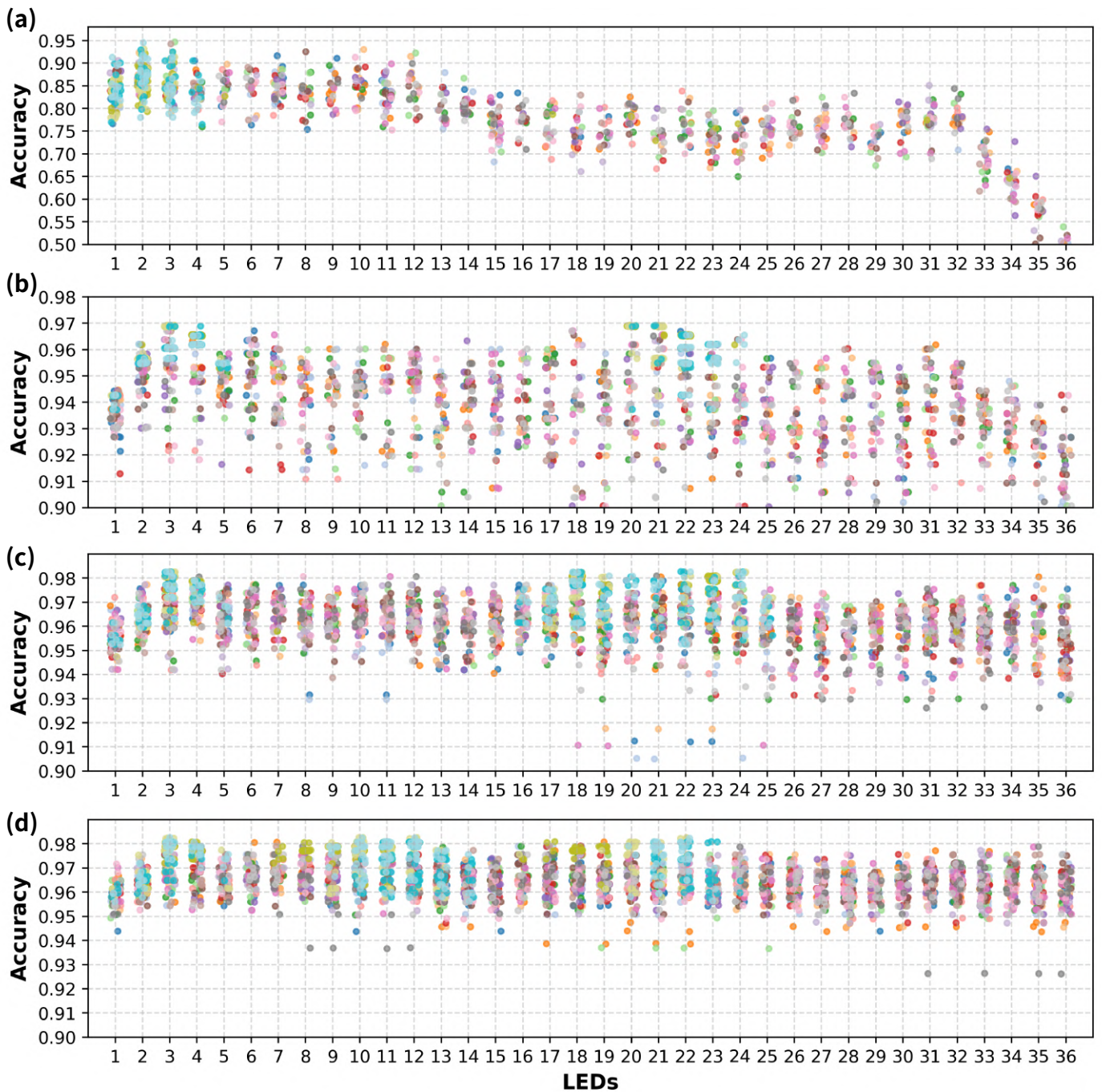


図4-3 LEDによる診断精度の変化

光源として用いるLEDによる、LEDの個数ごとの診断精度の分布。縦軸は診断精度、横軸はLED番号、それぞれのプロットはrandom samplerを用いたランダムなLED組み合わせの交差検証内における試行の平均診断精度を、プロットの色は1つの交差検証におけるLEDのペアを表す。試行回数が多いため、別の交差検証での組み合わせであってもカラーマップのストックが1順して同じ色が使用されている点、プロットの重なりをずらすためにx軸方向をプロットごとに少しずらしている点、aのみy軸の下限値が他と異なる点に注意。

- (a) LEDの個数が1個の場合。
- (b) LEDの個数が2個の場合。
- (c) LEDの個数が3個の場合。
- (d) LEDの個数が4個の場合。

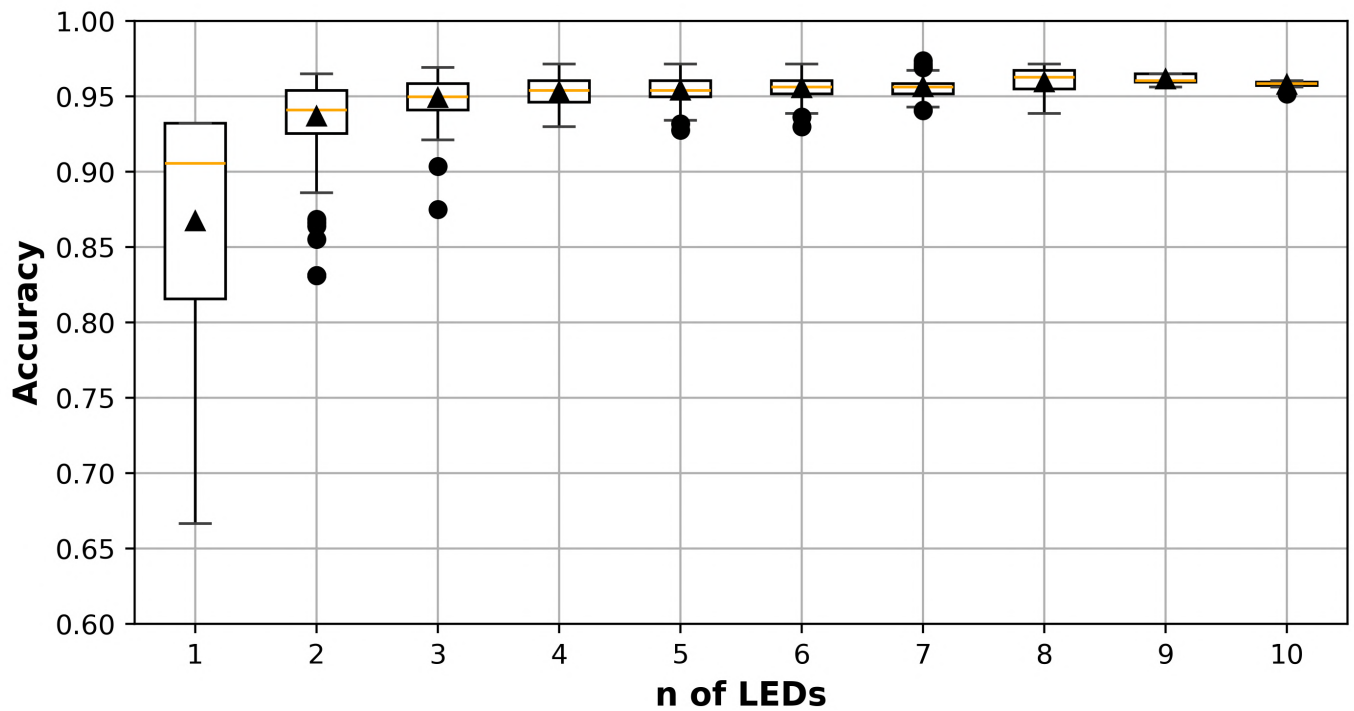


図4-4 LEDの個数による診断精度の変化

学習および診断に使用する、LEDの個数と診断精度の関係を表す箱ひげ図。縦軸は診断精度、横軸は励起光源として使用するLEDの組み合わせの個数を表す。箱はそれぞれの組み合わせ個数におけるハイパーパラメーターと波長組み合わせについて1000回の最適化を行った後に、交差検証データを用いて平均の診断精度を算出する試行を10回行った結果の分布を、▲は平均値を、箱内の黄線は中央値を、●は外れ値を表す。

使用するLEDの個数の増加にともなって診断精度のばらつきが減少し、また中央値も改善しているが、 $n > 4$ では診断精度の平均値の上昇はほぼ横ばいである。

4.2. 光源と光学系の開発

4.2.1. 単一LEDを用いた試作

試作機を考慮した使用LEDの最適化結果を踏まえて、単一のLEDを用いた簡易試作機を製作した。この試作機の目的は、励起光を利用した蛍光測定の実験と現実の違いを評価し、基本的な計測データを取得することである。価格、入手性、出力、発光の視認性から、使用LEDはLED 18 ($\lambda_{\text{peak}} = 365 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{center}} = 375 \text{ nm}$ 、FWHMshort = 8 nm、FWHMlong = 10 nm) のものを使用することとした。

光学系の設計においては、励起光を効率的に試料に照射し、試料からの蛍光信号を高い精度で収集することを重視した。具体的には、LEDからの光を対向したレンズ2枚を用いて集光およびコリメートし、セルの中心部に設置された試料を励起する構成を採用した（使用部品の型番については補遺8.3.2.）。試料からの蛍光は直交方向に設置したレンズで収集され、ロングパスフィルターを通過して不要な励起光を遮断した後、ファイバー端面に集光され、最終的に検出器へ導かれる。この光学系全体の配置概略を図4-5に、具体的な光学部品および治具の実際の配置を図4-6に、実際の試作機の外観を写真4-1に示す。LED自体は星型のアルミ基板にリフローはんだ付けし、アルミ製のヒートシンクにサーマルグリスを塗布した上でネジ止めされた。さらに、この構造体を3Dプリンタで出力した専用治具に取り付け、市販の光学定盤システムに組み込み、安定化電源で駆動した。試料セルには石英ガラス製のセルを使用した。

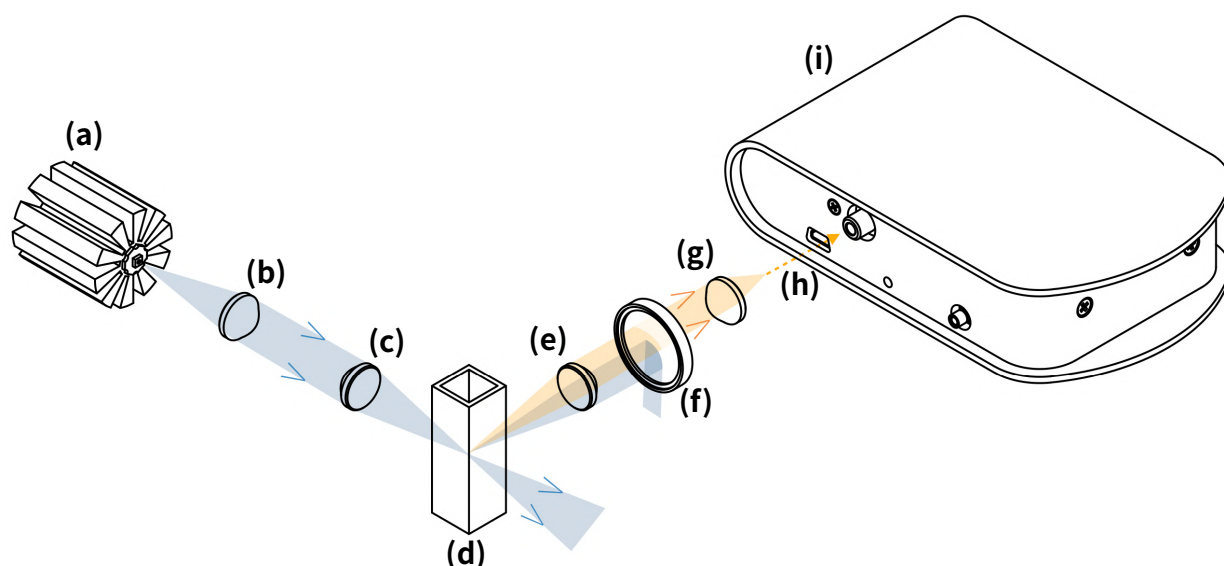


図4-5 1LEDの試作機の模式図

励起光源として1つのLEDを使用した場合の試作機と光学系の模式図。青線はLEDからの励起光、黄線はそれによって生じた蛍光のうち、設置した各レンズで集光されるものを表す。

(a) LED、(b) 励起光のコリメーターレンズ、(c) 励起光のコンデンサーレンズ、(d) 試料、(e) 蛍光のコリメーターレンズ、(f) 励起光のカットオフのためのハイパスフィルター、(g) 蛍光のコンデンサーレンズ、(h) 光ファイバー、(i) 市販の分光計。

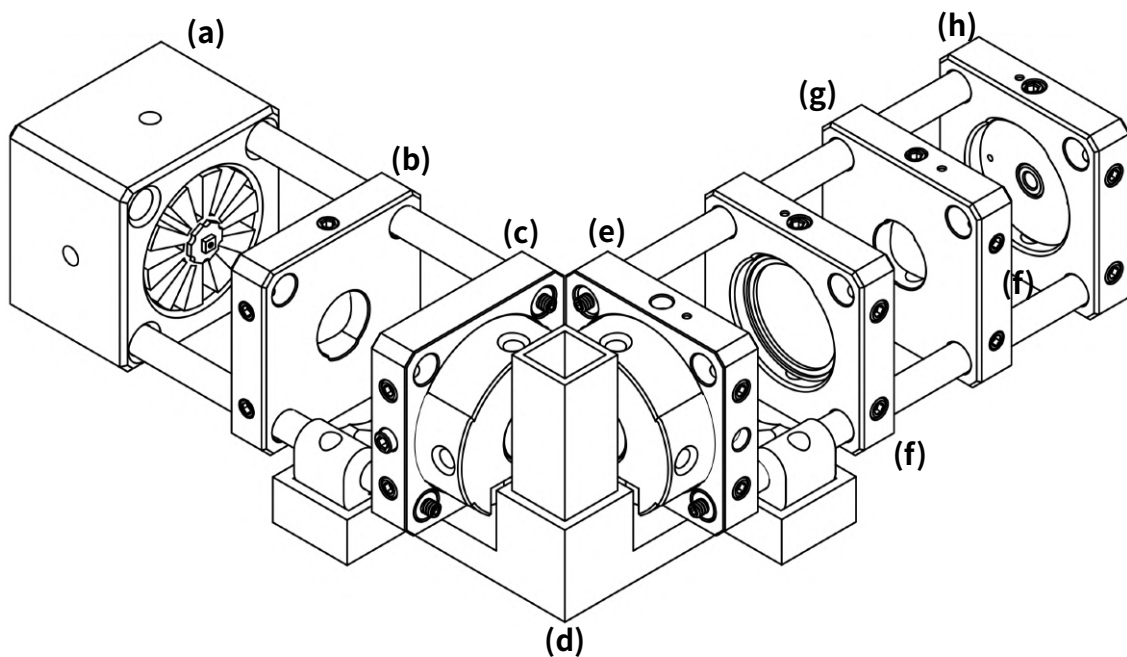


図4-6 1LEDの試作機の構成図

励起光源として1つのLEDを使用した場合の、試作機のパーツごとの構成図。

(a) LEDおよびヒートシンクと治具、(b) 励起光のコリメーターレンズ、(c) 励起光のコンデンサーレンズとレンズ-セル間を近接させるための治具、(d) セルホルダーおよびケージシステムのレール固定具のための治具 (e) 蛍光のコリメーターレンズとレンズ-セル間を近接させるための治具、(f) 励起光のカットオフのためのハイパスフィルター、(g) 蛍光のコンデンサーレンズ、(h) 光ファイバーのコネクタ

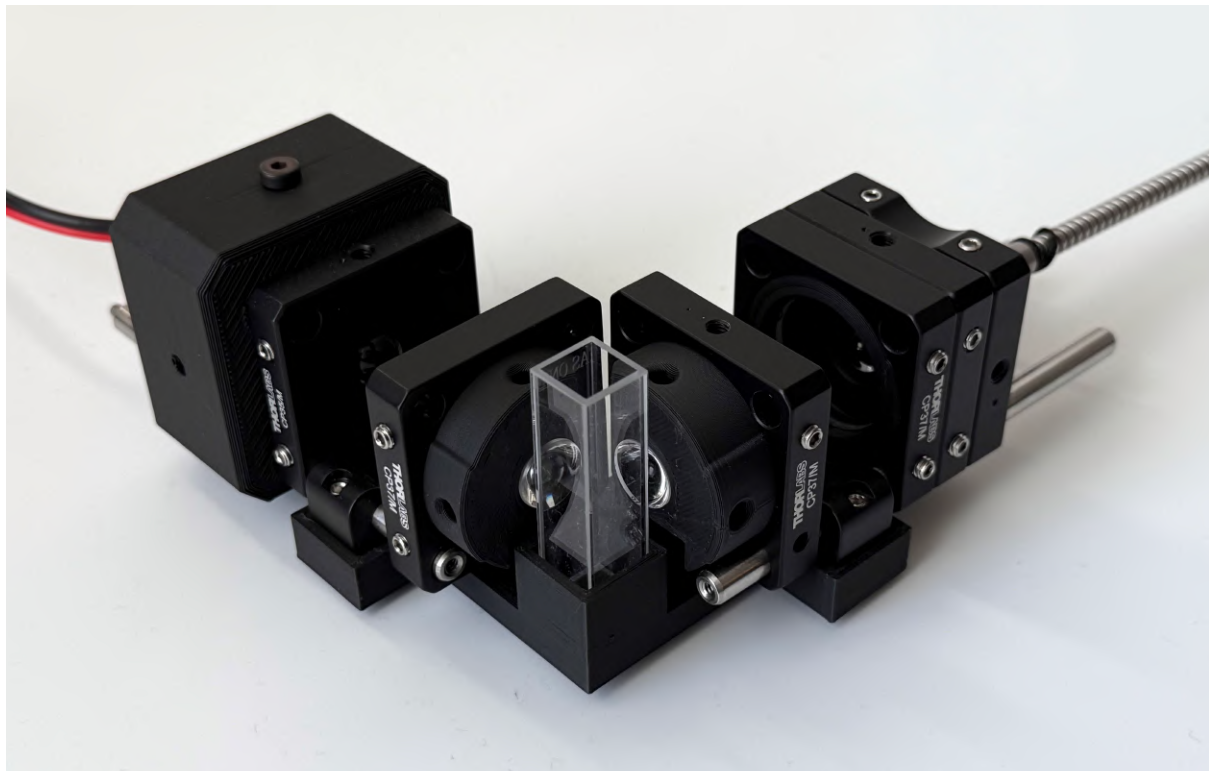


写真4-1 試作機の外観

単一LEDを用いた簡易試作機の外観。アルミ製ヒートシンクに搭載したLEDと2枚のレンズによる励起光を石英セル内の試料へ照射し、直交配置のレンズとロングパスフィルターを通して蛍光をファイバーへ収束する構造になっている。3Dプリントした専用治具を用いて各部品を固定し、市販の光学定盤システム上に組み込んだ。

4.2.2. 単一LEDを用いた試作による測定結果

試作機の基礎的な動作を評価するため、まず暗条件、明条件、純水、および細菌試料の4つを計測した(図4-7)。露光時間はそれぞれ10秒間とした。暗条件以外の計測結果では、いずれも励起光の迷光に起因すると考えられる365 nmを中心とした小ピークが観察された。明条件においてはセル壁面での励起光の散乱が主たる要因であると考えられる。一方、純水および細菌試料では、セル壁面での散乱に加えて、試料によるレイリー散乱が寄与している可能性が高い。また、励起光源の出力が高く、フィルターへの入射角が厳密でないために、ロングパスフィルター(OD4)の遮蔽性能を超える成分が検出器に到達している可能性が示唆される。さらに、450 nmから600 nmにかけて観測されたごくわずかな基線の隆起については、光学系に付着した汚れや塵、あるいは光ファイバーが励起光の迷光によって微弱な蛍光を発生させている可能性が考えられる。一方で、細菌試料の測定では、450 nm付近から急峻に立ち上がり700 nmまで続く大きく緩やかなピークが観測された。これは細菌由来の成分による蛍光である可能性が高い。試作機が細菌試料の蛍光特性を十分に捉える能力を持つことを示しており、さらに詳細な解析や条件最適化を進めることで、診断精度向上の可能性があると考えられた。

シミュレーションと実測値の整合性を確認するため、理想的なカットオフ波長を持つフィルターではなく、実際に使用したフィルターの透過特性を考慮した場合のシミュレーションと実測値との比較を行った結果を図4-8に示す。シミュレーションと実測値では450 nmから500 nmの領域で大きな乖離がある一方、500 nmから650 nmにかけては概ね同様の結果を示す事が明らかとなった。乖離については明らかな原因が同定できないが、蛍光分光光度計内の光電子増倍管を使ったモノクロメーターと、試作に使用した小型分光器内のラインCCDを使ったポリクロメーターの波長感度の違いが関与している可能性があると考えられた。

試作機の菌種識別能力を評価するため、4種の細菌試料(*S. aureus*、*E. coli*、*P. aeruginosa*、*A. baumannii*)を計測した結果を図4-9に示す。各細菌種についてそれぞれわずかに異なる蛍光スペクトルパターンを測定することが可能であった。これらのスペクトルデータは、異なる細菌種間の1励起波長区間における蛍光特性の差異を示しており、3章で論じた機械学習においてこれらの蛍光スペクトルの波形や強度を特徴量として用いることで、細菌種の識別が可能である可能性を示唆している。一方で図4-8で示したようにLEDの種類だけでなくカットオフフィルターについても市販品の選択肢をパラメーターデータに変換した上で、診断精度に関与する変数としてベイズ最適化に組み込み、使用するLEDとの最適な組み合わせをより詳細に模索することで、より正確な診断精度を予測することが可能になると考えられる。

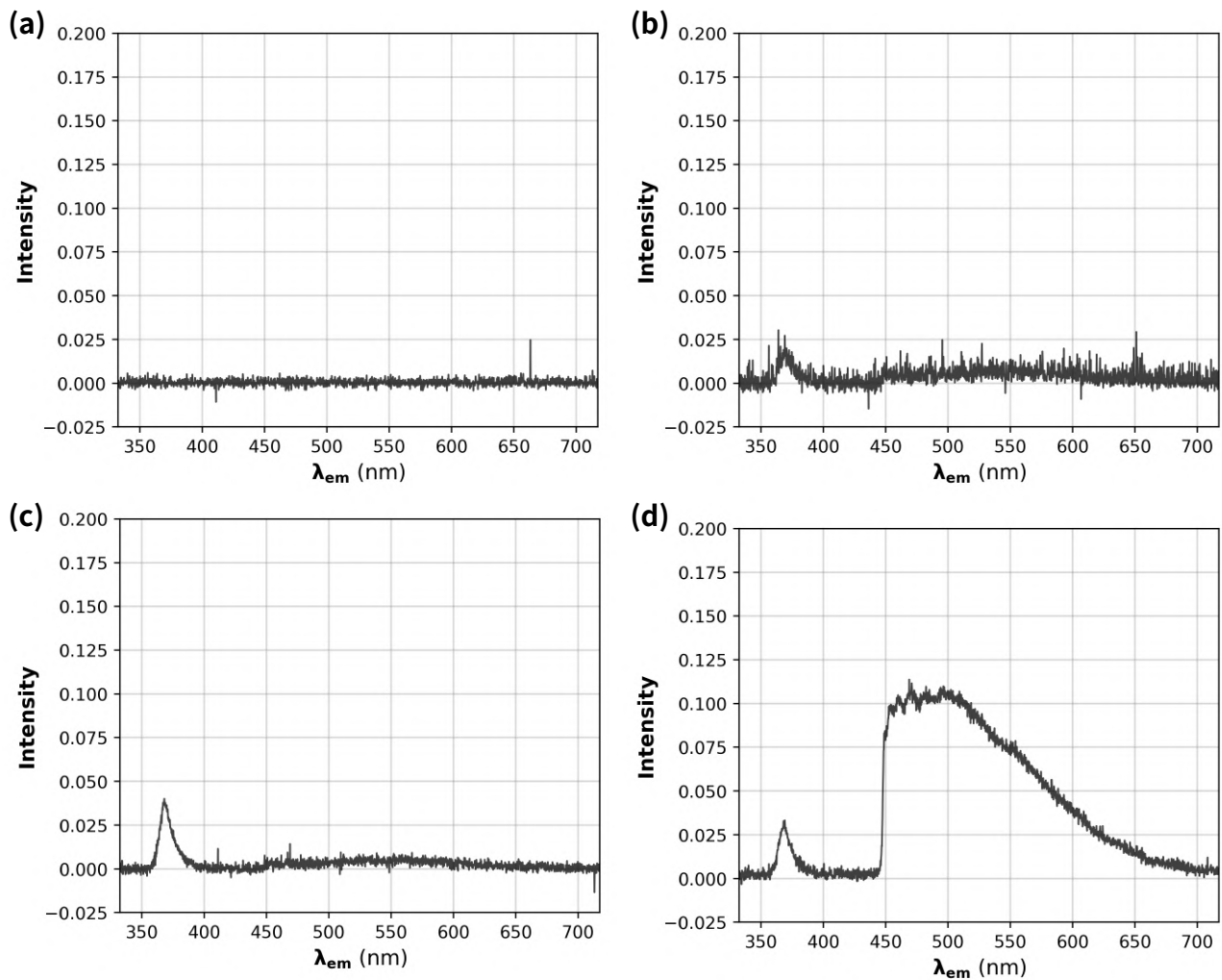


図4-7 試作機による予備実験の結果

図4-6で示した試作機による、暗条件（キュベットののみ）、明条件（キュベットののみ）、純水、細菌サンプルのそれぞれの計測結果。縦軸は信号強度、横軸は蛍光波長。

(a) 暗条件。

(b) 明条件。ロングパスフィルターを配置しているが、そこを抜けてくる励起光源360 nmの迷光があることがわかる。

(c) 純水。同じように励起光源360 nmの迷光があることがわかる。

(d) *S. aureus*の濁度0.25のサンプル。励起光源360 nmの迷光以外に、450 nmから急激に立ち上がる長波長側の蛍光の存在がわかる。

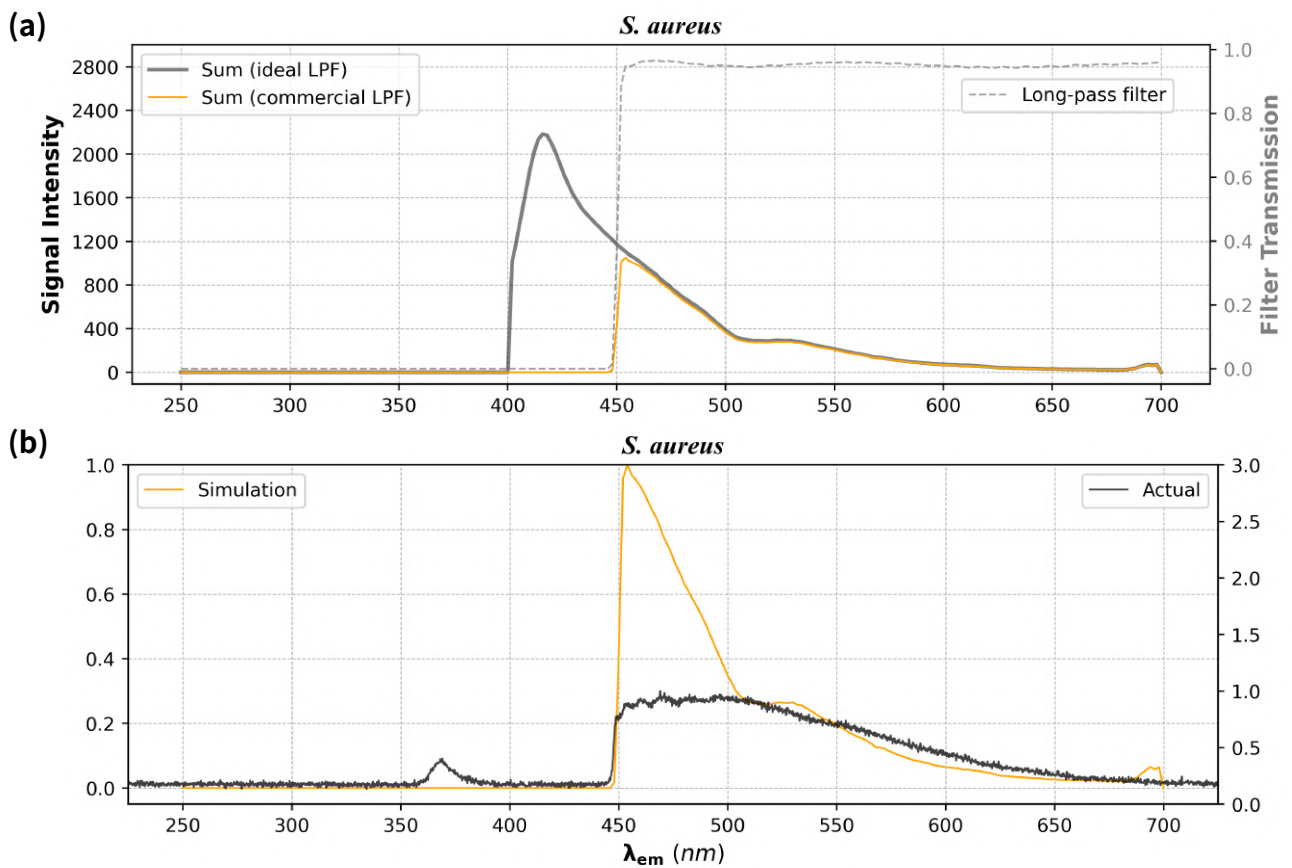


図4-8 シミュレーションによるLEDを励起光として使った場合の合成蛍光スペクトルと、実測値の比較

(a) シミュレーションの場合。左縦軸は信号強度、右縦軸はフィルターの透過率。横軸は蛍光波長。黒線は図4-2で示した、理想的なロングパスフィルターを使用した場合の重みの付いた合成蛍光スペクトル。黄線は試作に使用したロングパスフィルターの透過スペクトルを黒線に適用させた場合。

(b) 試作による実測値。左縦軸はシミュレーションの正規化した信号強度、右縦軸は実測値の正規化した信号強度。それぞれ横軸は蛍光波長。波形を比較するために最大値が異なっていることに注意。

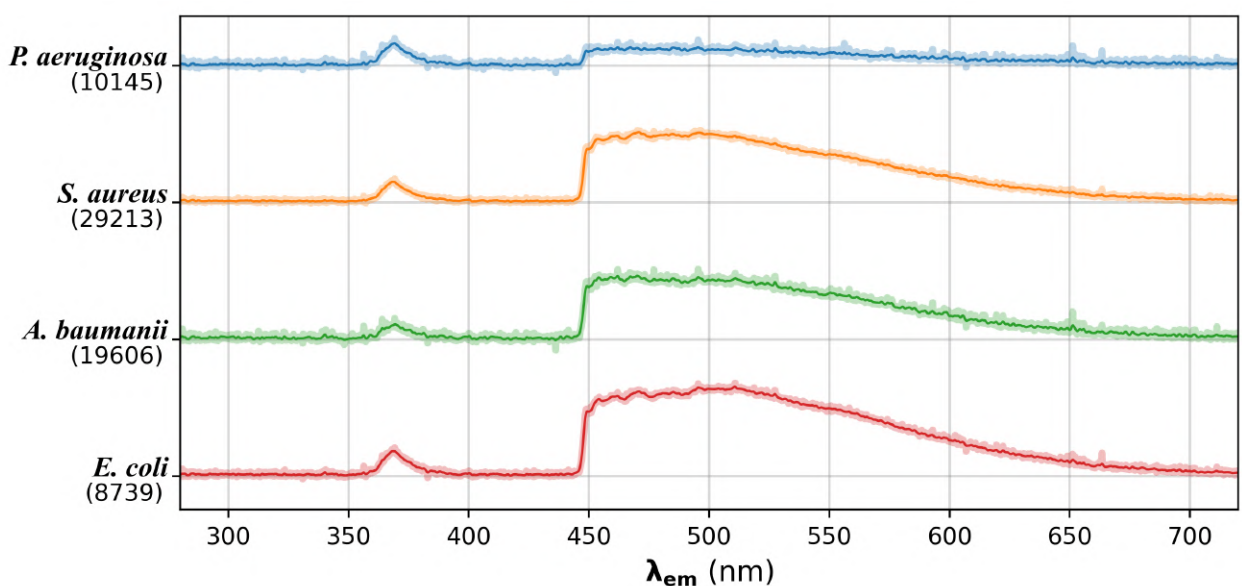


図4-9 試作機による菌種ごとの波形の違い

4菌種それぞれ1サンプルずつにおける計測結果の比較。それぞれのサンプルについて10秒間の露光を5回繰り返したものを積算した。薄い帯は積算値、濃実線はその移動平均線。

4.2.3. 複数LEDを用いた試作

単一LEDによる初期的な試作機で得られた知見を踏まえ、さらなる診断精度向上を目指して励起用光源を4つの異なる波長を持つLEDへ拡張し、複数波長励起を実現可能な試作機を構築した。セル周囲に90度間隔で4つのLEDを配置する構造によってサンプルへの照射効率を維持しつつ、光学系全体の小型化を図った。このとき、LEDごとに印加電圧および電流値が異なるため、個別のPWM駆動を用いた定電流源回路を設計して各LEDを独立に制御可能とし、上位に配置したマイクロコントローラーによって点灯タイミングや分光計へのトリガー信号を同期させることで任意のシーケンスによる励起と計測を可能にした。光学系設計においては励起光を効率的に照射するため、4.2.1.で述べたように各LED前面に非球面レンズを配置し、複数励起光を効果的にサンプルへ導く構成をとった（使用部品の型番については補遺8.3.3.参照）。具体的な光学部品および治具の実際の配置を図4-10に、実際の試作機の外観を写真4-2に示す。

生じた蛍光の計測では、4つの励起光軸に対して直交する面としてセル底面から集光する構成とした。平行光部分でロングパスフィルターをマイクロコントローラー制御のサーボモーターによって切り替えることで、各LED波長に対する最適な蛍光スペクトル取得を実現した。このような複数光源構成や3次元的な配置はサンプルへの励起光分布を均一化し、蛍光強度の増大と光学効率の向上に寄与したと考えられる。

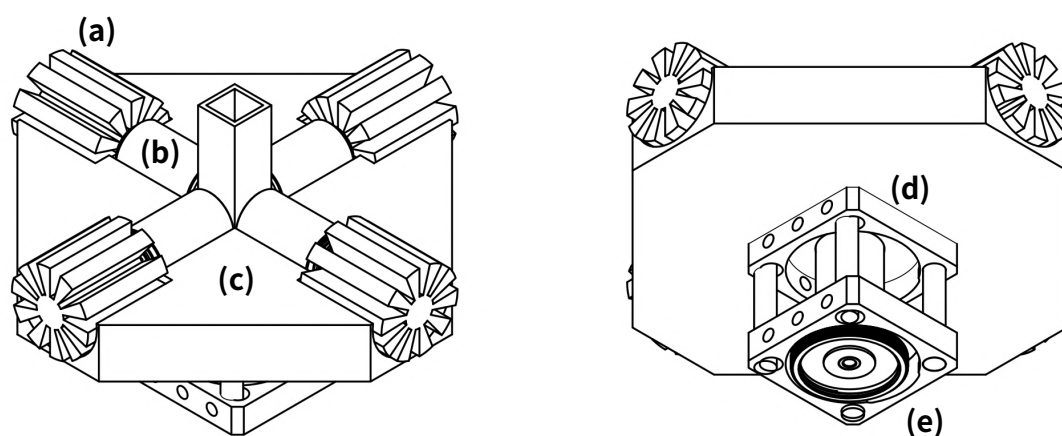


図4-10 4LEDの試作機の構成図

励起光源として4つのLEDを使用した場合の、試作機のパーツごとの構成図。上面図と底面図を示す。

(a) LEDおよびヒートシンク、(b) 励起光のコリメーターレンズとコンデンサーレンズおよびホルダ、(c) a、bおよびセルおよびdのケージシステムのレール固定具のための治具 (d) 蛍光のコリメーターレンズ、コンデンサーレンズ、励起光のカットオフのためのハイパスフィルター、およびホルダ、(e) 光ファイバーのコネクタ

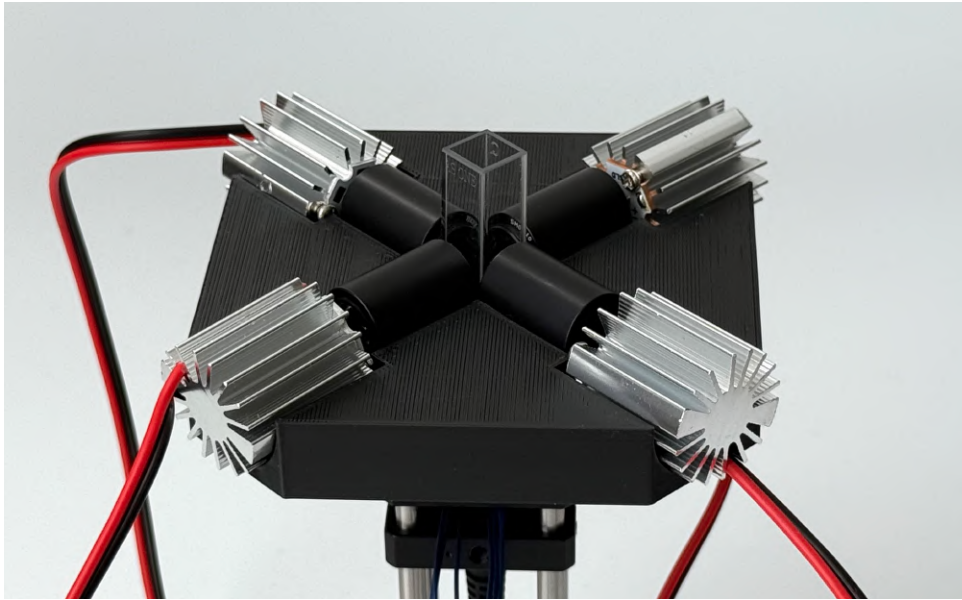


写真4-2 試作機の外観

複数LEDによる試作機の外観。セル周囲に90度間隔で配置した4つの異なる波長LEDを、非球面レンズを介して各々独立制御する構造を採用している。LEDごとにPWM駆動を用いた定電流源回路を組み込み、マイクロコントローラーが点灯タイミングと分光計のトリガーを同期させることで、励起光の切り替えや蛍光スペクトルの取得を一貫して行うことができる。

4.3. 検出系の開発

4.3.1. 分光計のセンサー温度による暗電流ノイズ

複数のLEDを用いた試作機を開発し、励起波長の多様化による診断精度向上を試みた過程で、長時間の駆動に起因する暗電流ノイズの増加や筐体温度の上昇に伴う信号値の変動が一部で観測された。自家蛍光は極めて信号強度が弱いため、こうしたノイズの顕在化は信号対雑音比の低下を誘発し、最終的には診断精度を損ない得ることが示唆される。この問題を明確化するため、市販の分光計において筐体温度を制御し、暗条件時の波形を取得したところ、温度上昇に伴うバックグラウンドノイズの顕著な増加が確認された（図4-11）。例えば、冷風冷却による低温状態（約22℃）や室温における計測初期では比較的安定した信号が維持されていた一方、30分間の断続的な計測後（約29.37℃）にはバックグラウンドノイズが徐々に増大する傾向が生じ、さらなる加熱時には一段と顕著なノイズ増加が観測された。また、30分程度の駆動による温度上昇でもバックグラウンドノイズの増加が観測されたことから、長期運転下では温度管理が不可欠であることがより明確となった。

サーモグラフィーによる観察では、内部回路やセンサー素子からの発熱が金属製筐体全体へと受動的に拡散していると考えられる（図4-11c）。内部構造は非公開ゆえ確定的な議論は難しいが、少なくとも顕著な局所的発熱源の偏在は見られなかった。いずれにせよ、微弱な蛍光信号の高精度計測において温度安定性は極めて重要である。温度変化は光学素子の膨張・収縮や屈折率の変化を招き、波長ドリフトやスペクトル分解能の低下を引き起こし、微弱信号のS/N比を低下させる可能性がある。これらは測定の再現性や信頼性を低下させる要因となるため、センサー冷却や恒温化による効果的な熱管理が求められる。しかし、市販の分光計はセンサー冷却を想定した設計ではなく、内部センサーへのユーザーアクセスが困難であるため、既存機器の改修には大きな制約がある。さらに、冷却機能付きの市販分光計は極めて高価であることが多い。したがって、これらの課題を克服するために、分光計自体を設計、試作することとした。

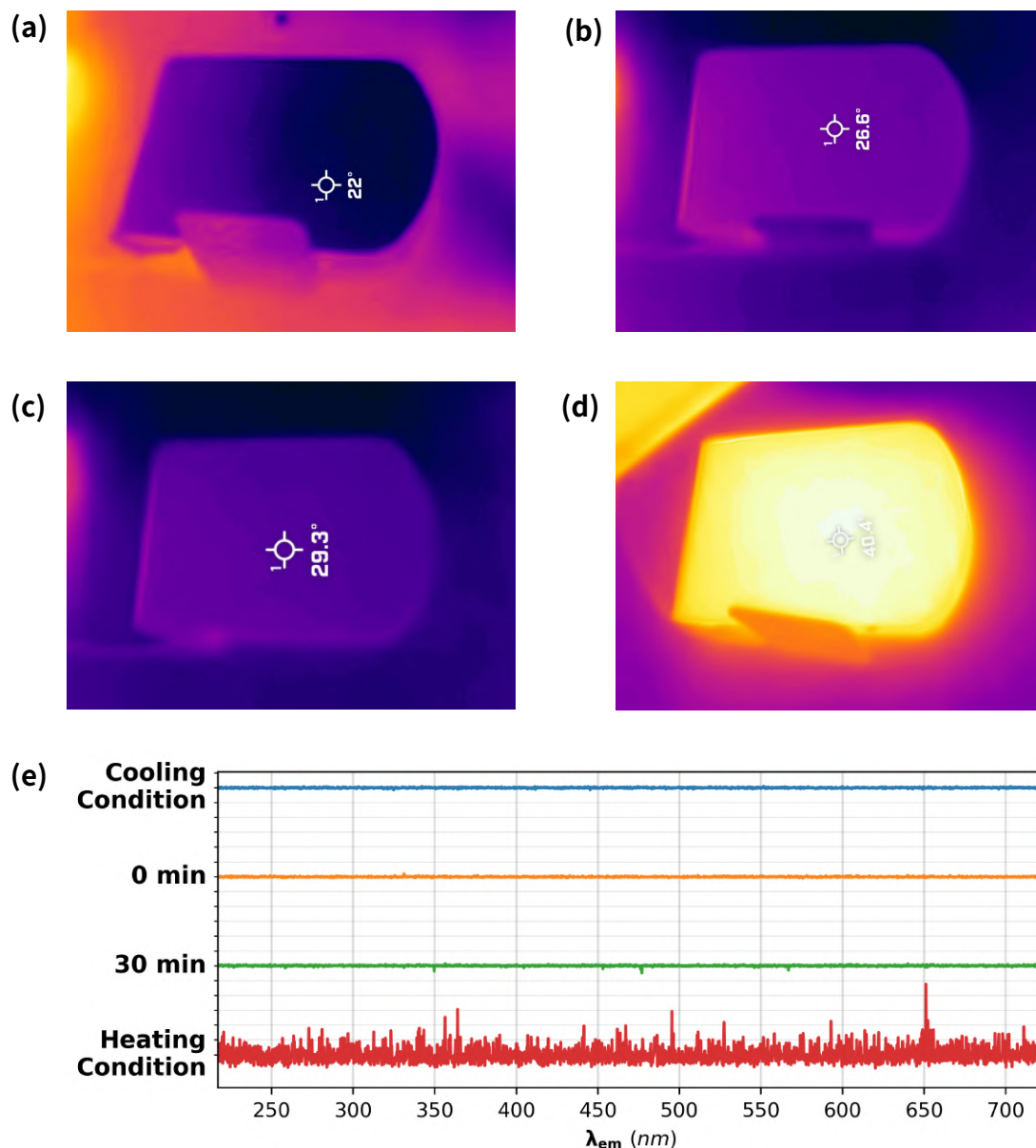


図4-11 市販の分光計の温度による暗電流ノイズの比較

- (a) 冷風による冷却後の筐体の表面温度のサーモグラフィー。
- (b) 室温での計測開始（露光1回目終了後）時の筐体の表面温度のサーモグラフィー。
- (c) 室温での長時間計測後（断続的な30分の露光終了後）の筐体の表面温度のサーモグラフィー。
- (d) 温風による加熱後の筐体の表面温度のサーモグラフィー。
- (e) a-dの各条件時の暗条件での計測。横軸は計測波長、縦軸は正規化していない信号強度。

4.3.2. 分光計の設計と試作

回折効率、構造の簡易さ、価格、そして調整性を考慮した総合的な検討の末、反射型ブレード回折格子とレンズベースの光学系を組み合わせた分光器を設計し（図4-12）、試作した（写真4-3）。顕微鏡用対物レンズによる入射光の高効率な収束と、50 μm 幅の狭スリットを用いた光束制御によって、適切な波長分解能と十分な感度を保持しつつ、レンズのみによる光路形成により調整の容易化を図った。対物レンズより入射した光はスリットを通過後、回折格子により波長ごとに分離される。分光像はイメージングレンズを介して2次元CMOSセンサー上に集光され、USBインターフェースを通じて接続したPCに表示される。レンズベースの設計は光路を直線的に保ち、また反射型光学素子を必要最小限に抑えることで回折光

の回折光の反射による迷光の発生を抑制する工夫を施している（使用部品の型番については補遺8.3.4.参照）。これにより、試作段階における複雑な光学アライメントの調整の回数を減らすことが可能である。加えて、モジュール化された構造は、センサーや回折格子の交換、検出器のキャリブレーション、さらにはフィルター特性の変更など、後続の拡張や改良を容易にする。こうした柔軟性は、異なる測定対象への適用性を高め、将来的なシステムアップグレードにおいても有利に働くと考えられた。

このように、ブレード回折格子による高い回折効率とレンズベース光学系による装置小型化や調整性の確保、そして堅牢な機械的設計による安定性およびモジュール構造による拡張性のすべてが一体となることで、試作した分光計は拡張性の高い、市販の分光計では困難だった要求を総合的に満たす。実測段階でのデータ取得や解析も容易となった。

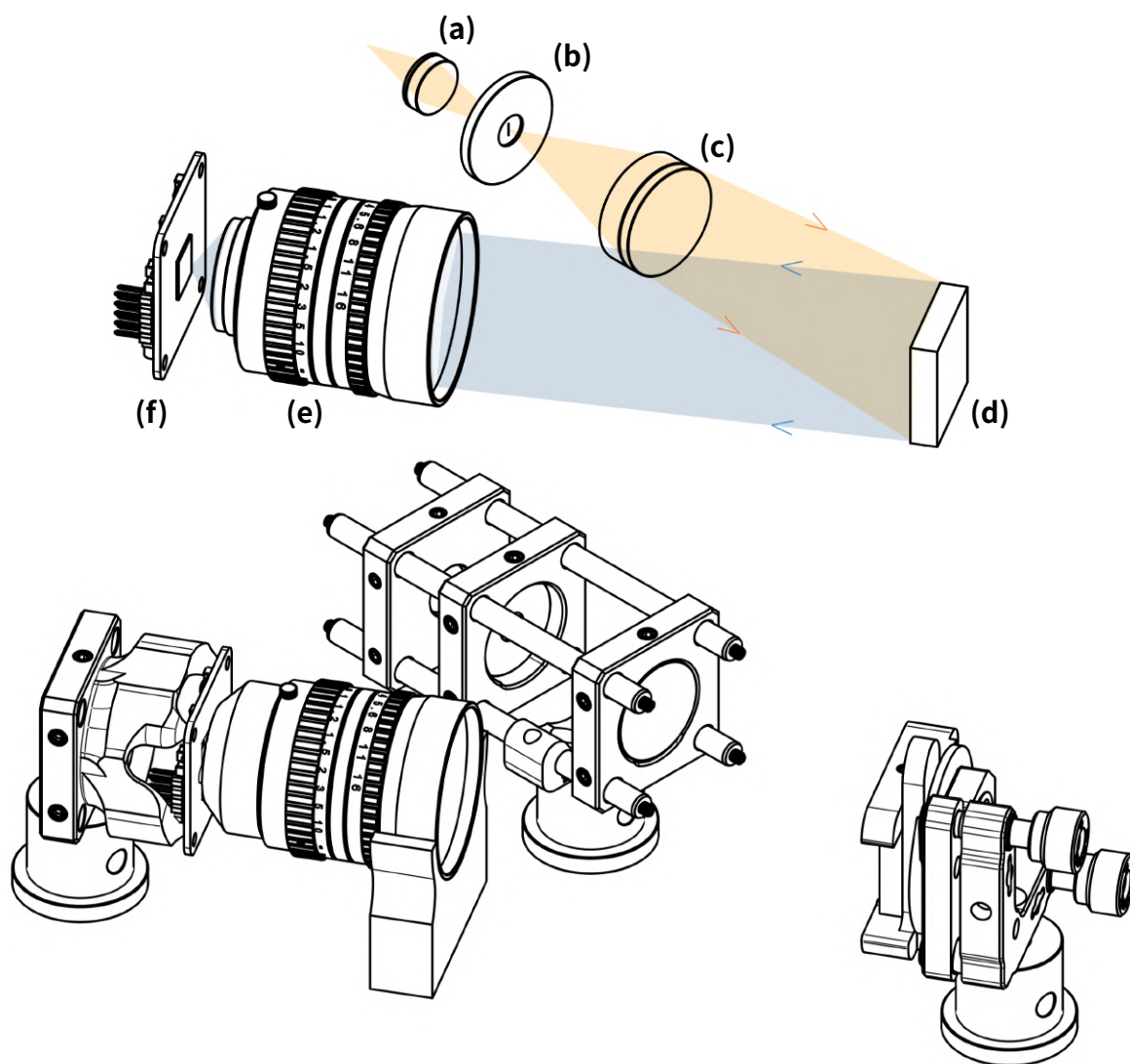


図4-12 反射型回折格子とレンズを使用した分光計の模式図

反射型ブレード回折格子を用いた、レンズベースの分光計の試作機の光学系の模式図。黄線はサンプルからの光、青線は回折格子で回折された光線を表す。

(a) コリメーターレンズ、(b) スリット、(c) コリメーターレンズ、(d) 回折格子、(e) イメージングレンズ、(f) センサー



写真4-3 試作機の外観

光学定盤上に既成の治具と3Dプリンタで出力した治具とを組み合わせた配置された分光計の試作。左側に配置されたセンサーの信号は左端のUSBケーブルから接続されたPCへと出力される。

4.3.3. 試作した分光計の性能評価

試作した分光計の性能を評価するため、まずネオンランプを用いて波長校正を行った（写真4-4）。ネオンなどの希ガスを封入したランプは離散的な輝線スペクトルを有しており、既知の輝線間隔²を利用することで波長分解能や測定系の精度を検証することができる。計測したネオンランプの分光像と、画像から計算される信号強度分布を図4-13に示す。結果として極めて高い波長分解能が実現され、近接した輝線を明確に分離しうることが明らかとなった。

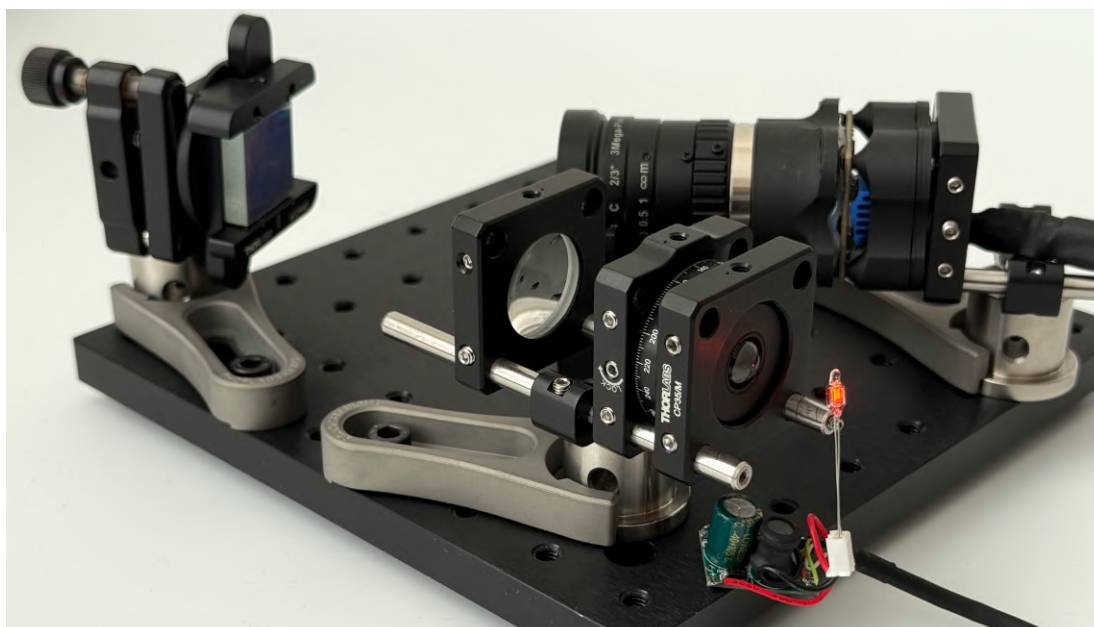


写真4-4 試作機を用いたネオンランプの計測

試作機を用いて、既知の輝線を持つ光源としてネオンランプを対象とした計測を行った。反射型ブレード回折格子を用いた新規分光計システムの波長分解能と検出感度の評価。ネオンランプの特徴的な輝線スペクトルを基準光源として使用し、システムの波長校正と分解能評価を実施。小型光学ベンチ上に構築された光学系により、既知の波長における応答性を検証している様子。

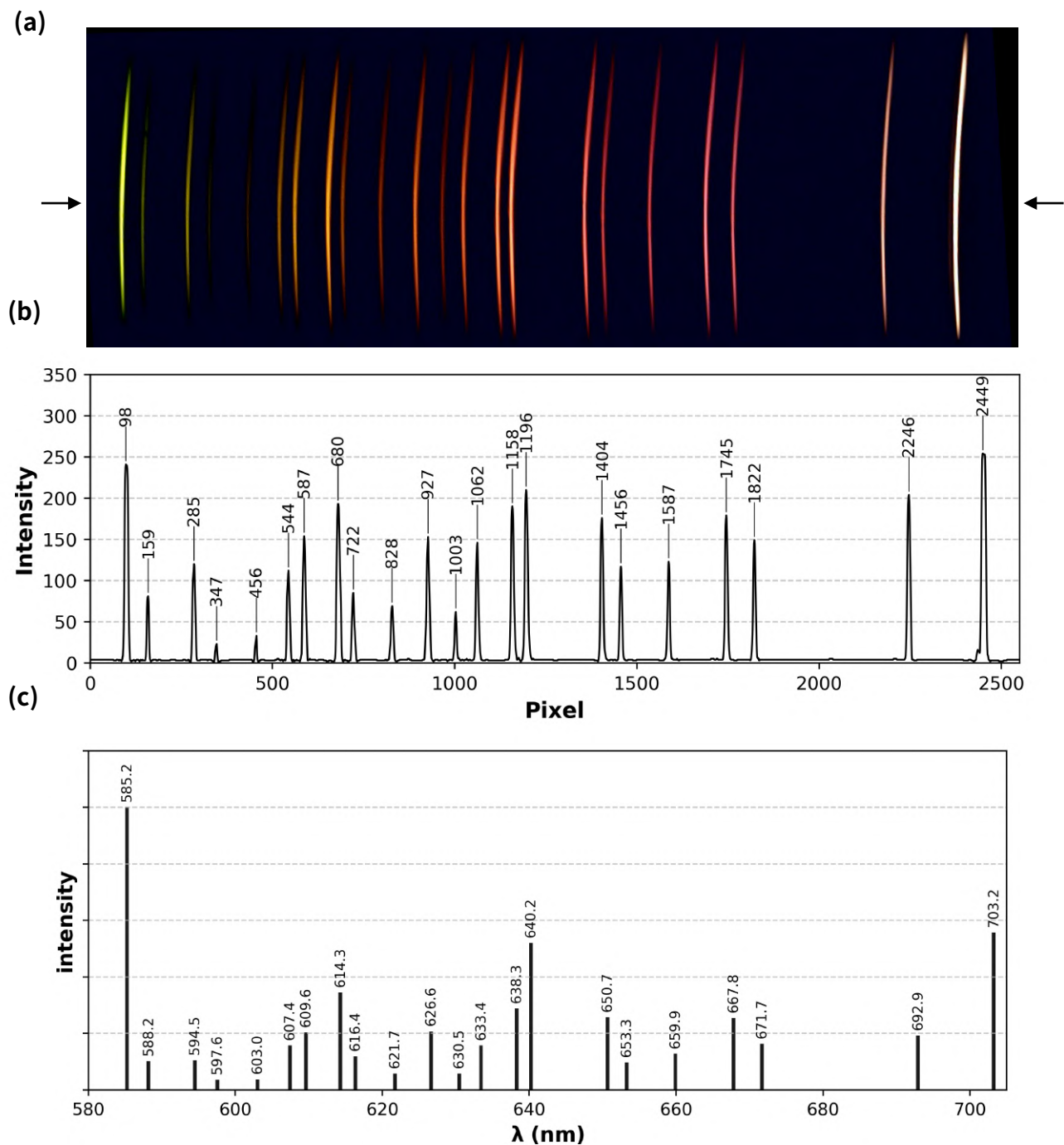


図4-13 試作機によるネオンランプの計測結果

(a) イメージセンサーで取得したネオンランプの分光像。回折格子によって分離された輝線が可視化されている。画像左右の矢印はbの強度分布プロファイル抽出線を表す。

(b) aから得た信号の強度分布。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

(c) National Institute of Standards and Technology (NIST) データベース (文献2) より作成したネオン輝線スペクトル。bで示した観測結果と整合する輝線パターンが確認される。

また図4-13cに示したNISTデータベースを基にした580 nmから710 nmにわたるネオンの輝線スペクトルをこれら既知の輝線パターンと比較すると、良好な整合性が得られていることがわかる。さらにネオンランプの既知の輝線波長と、2次元CMOSセンサー上でのピクセル位置（x座標）との対応関係を図4-14に示す。両者の間には明瞭な線形相関が存在することが確認され、ネオンランプの既知波長とCMOSセンサー上のピクセル位置の対応関係において、16点の校正データで完全な直線性（ $R^2=1$ ）が得られた。この明瞭な線形相関は、回折格子の分散特性と幾何学的アライメントが理論的に理想的な状態に近いことを示唆している。また、傾きや切片を通じて分散特性や初期アライメント条件を容易に把握できる点は、今後の性能改善において重要な指標となる。

ピクセル位置と波長との対応関係から試作した分光計の半値全幅（Full Width at Half Maximum：FWHM）を図4-15に示す。波長特性の詳細な分析から、585 nm付近ではFWHMが0.57 nm、700 nm付近では0.70 nmという測定結果が得られ、高い波長分解能が実現されていることが実証された。さらに、ピーク強度が最大250カウント程度に達しても飽和に至らない点から、検出器の十分なダイナミックレンジが確保されていることが確認された。加えて、良好なSN比とピーク形状の対称性は、光学歪みが極めて小さく、分光計全体の幾何学的設計が実装と高い精度で一致していることを示している。一方で両ピークはガウス分布に近い対称性を維持しているものの、長波長側でわずかなスペクトル純度の低下が観察された。

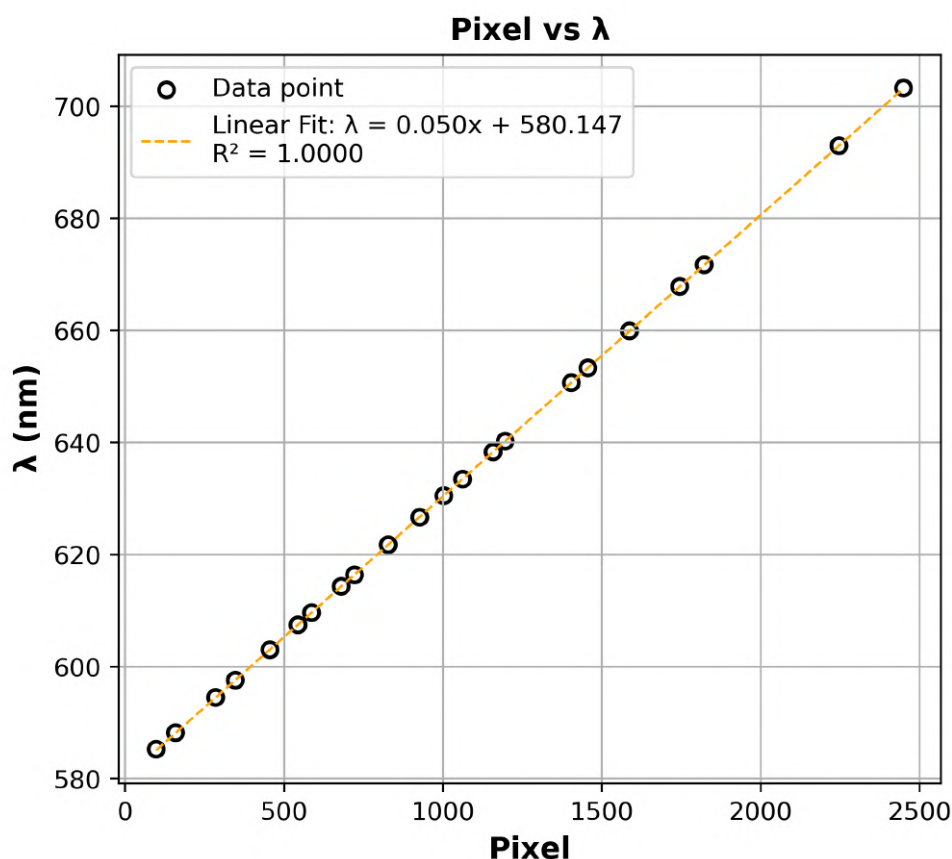
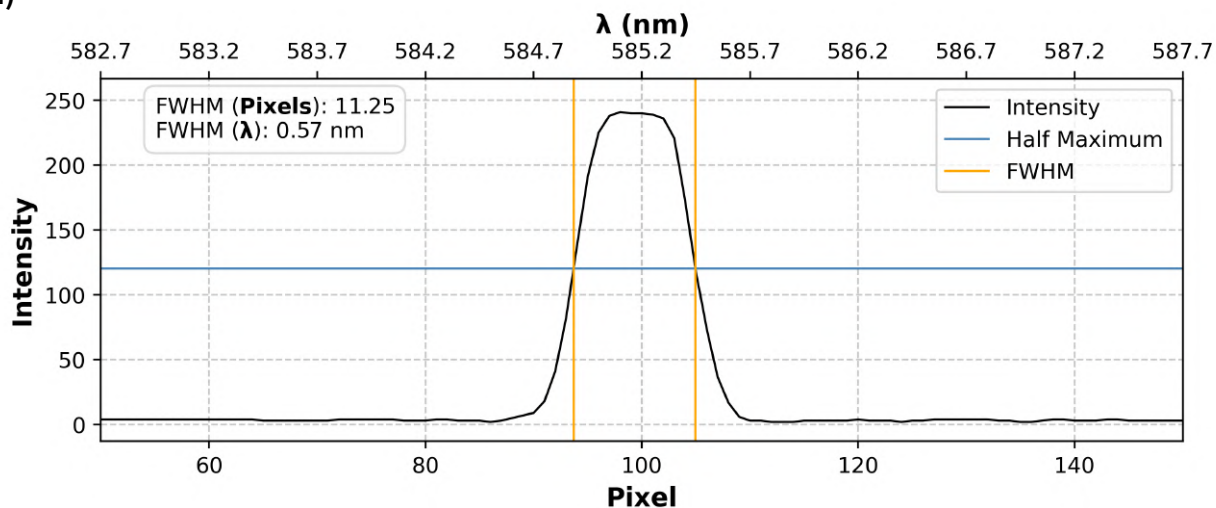


図4-14 試作した分光計の波長校正曲線

ネオンランプの既知の輝線波長と、2次元CMOSセンサー上でのピクセル位置（x座標）との対応関係を示すプロット。縦軸は波長、横軸はCMOSセンサー上でのピクセル位置、○はセンサー画像上のピークに対応する既知の輝線波長とセンサー上でのピクセル位置を、黄破線は一次近似線を表す。

(a)



(b)

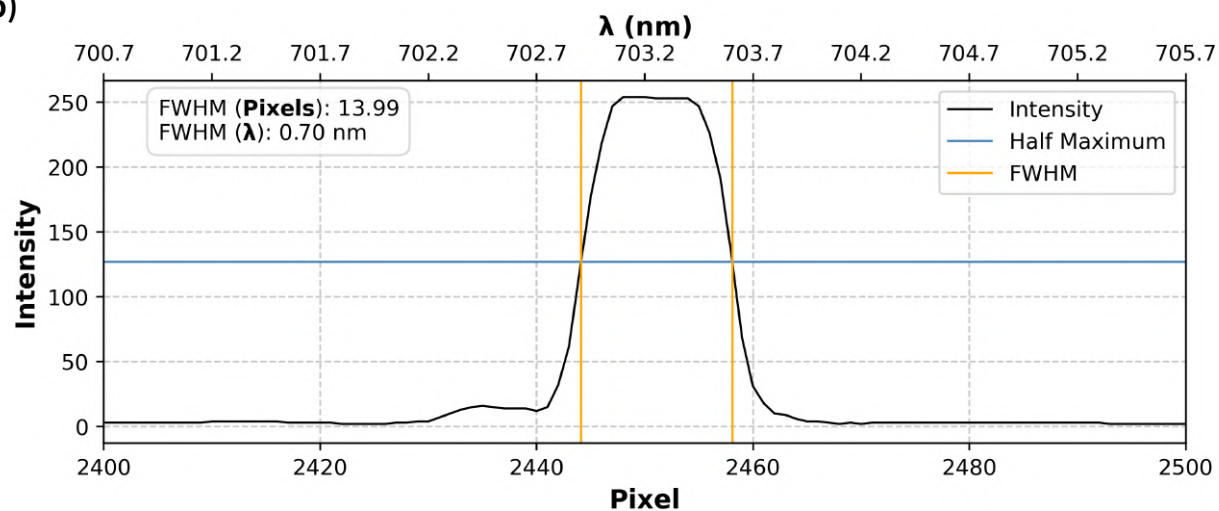


図4-15 試作した分光計のFWHMの算出

ネオンランプを使った2つのスペクトルピークにおけるFWHMの解析結果。縦軸は信号強度、横軸は画面上のピクセル位置、黒線はピクセル位置ごとの信号強度分布、青水平線はピークの半最大値 (Half Maximum)、橙垂直線は左右のFWHMの境界を表す。aとbでx軸の表示範囲が異なっている点に注意。

(a) 585.2 nmのスペクトルピークのFWHM。

(b) 703.2 nmのスペクトルピークのFWHM。

一方で4.2.1.の試作機における市販の分光計と試作した分光計とを置換し、細菌懸濁液サンプルの蛍光信号を測定しようとしたところ、信号を得ることができなかった（図4-16）。この原因として、単純な検出器の感度不足に加え、CMOSセンサー側の最大露光時間に対する制約やイメージングレンズによる紫外光の吸収などが複合的に影響したと考えられる。このように微弱光計測の領域において、現行システムには依然として克服すべき課題が残されていることが明らかとなった。この課題を克服するため、次節ではより微弱な蛍光信号でも捉え得るさらなる分光計の高感度化の実現を目指した。

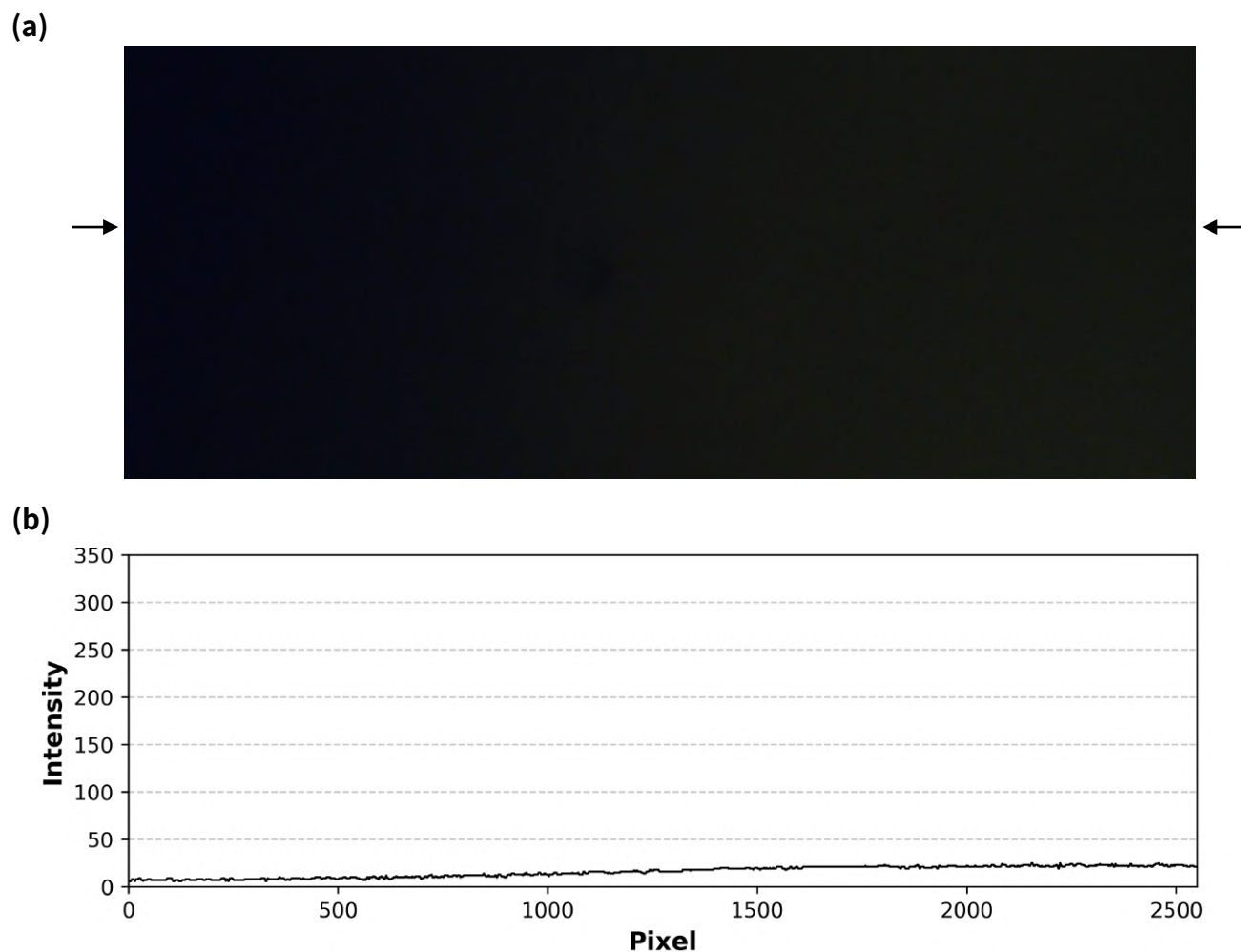


図4-16 試作機による細菌サンプルの計測結果

(a) イメージセンサーで取得した細菌サンプルの分光像。画像左右の矢印はbの強度分布プロファイル抽出線を示す。

(b) aから得た信号の強度分布。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

4.3.4. 微弱光計測のための分光計の設計と試作

細菌自家蛍光の計測感度を現行のセットアップからより高感度なものに引き上げるため、既知特性を有するレーザー誘起ラマン散乱光を校正光源として導入し、その検出を通して装置感度や分解能の評価を行った。ラマン散乱は蛍光と比べて極めて微弱な信号であり、これを安定的に観測することができれば、微弱光計測の性能指標となると考えられた。細菌の自家蛍光をベースとする場合には、ピークが広く拡散してしまい信号の見極めが困難であったが、ラマン散乱は原理的に励起光の波長幅に比例した狭いピークを有するため、微弱光源であってもピーク位置および強度を精密に判定しやすいという利点がある。

こうした設計指針に基づき、前節で試作した分光計をもとに改良を行った。532 nm帯のダイオードレーザーを励起光源とし、同軸配置を継承するとともに、迷光除去に有効なロングパスダイクロイックミラーを新たに導入した。また入射スリット、回折格子、結像面の位置関係を精密に制御するため、オートコリメーション機構を光学系へ組み込んだ（使用部品の型番については補遺8.3.5.参照）。これらの要素技術を統合した試作機の設計を図4-17に、実際の試作機外観を写真4-5に示す。

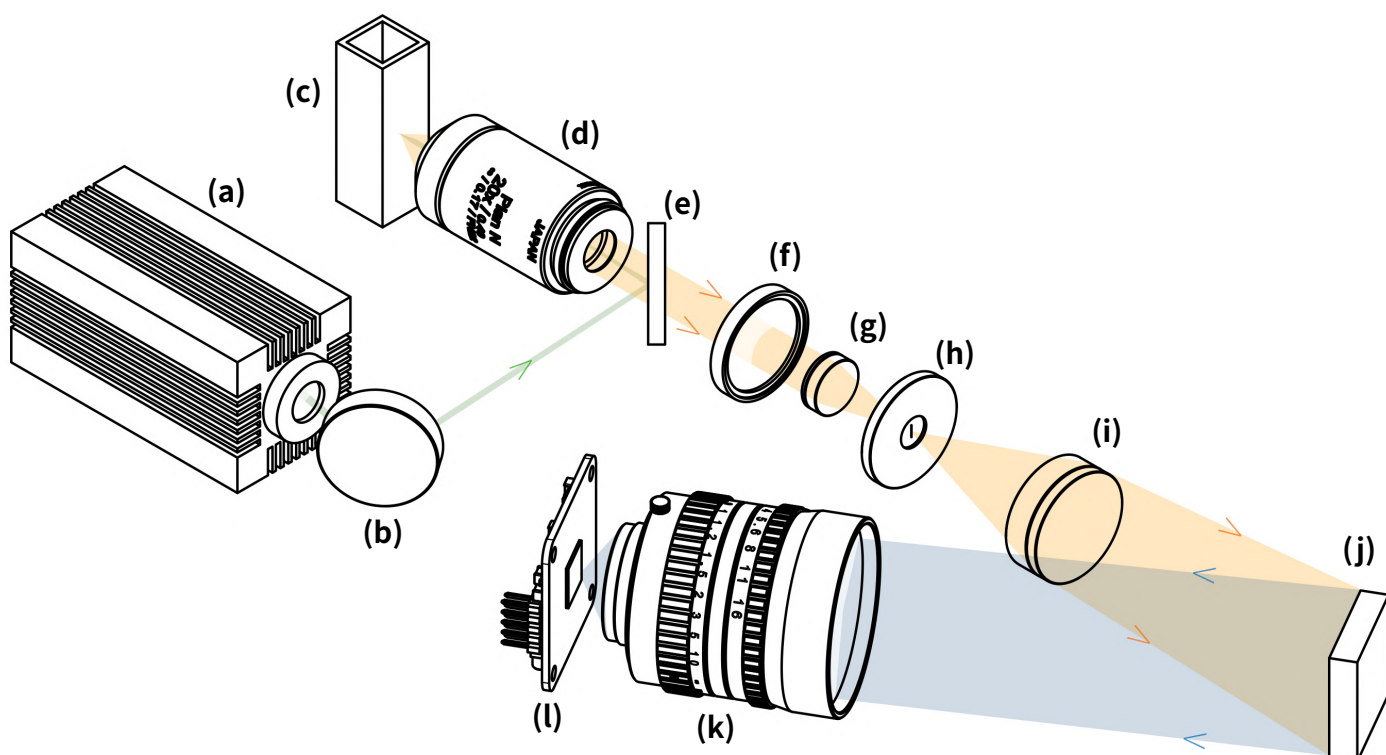


図4-17 ラマン分光計の光学系構成図

反射型ブレード回折格子を用いた、レンズベースのラマン分光計の試作機の光学系の模式図。

緑線は励起光源であるレーザーからの光、黄線はサンプルからの光、青線は回折格子で回折された光線を表す。

(a) レーザーモジュール、(b) ミラー、(c) セル、(d) 対物レンズ、(e) ダイクロイックミラー、(f) ロングパスフィルター、(g) 集光レンズ、(h) 光学スリット、(i) コリメーターレンズ、(j) 回折格子、(k) イメージングレンズ、(l) センサー

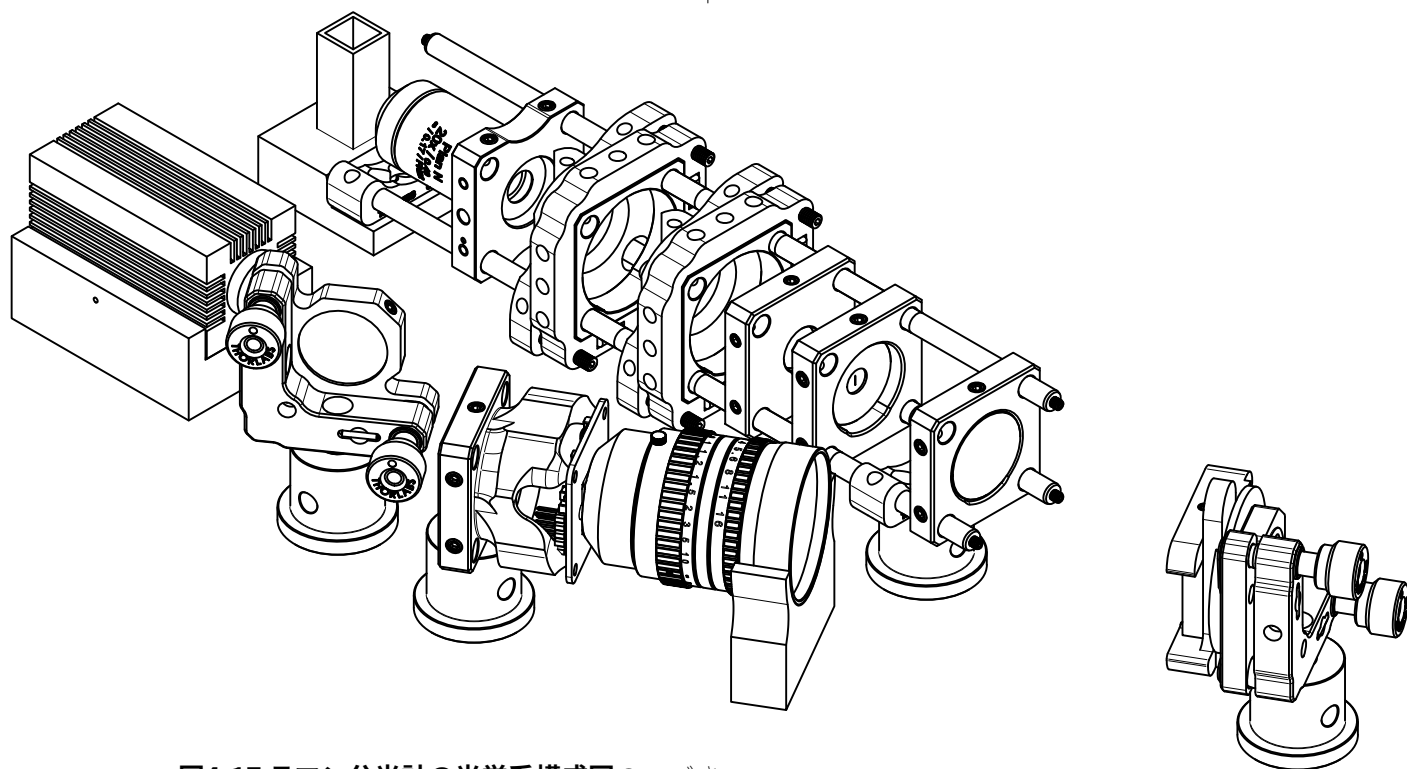


図4-17 ラマン分光計の光学系構成図のつづき

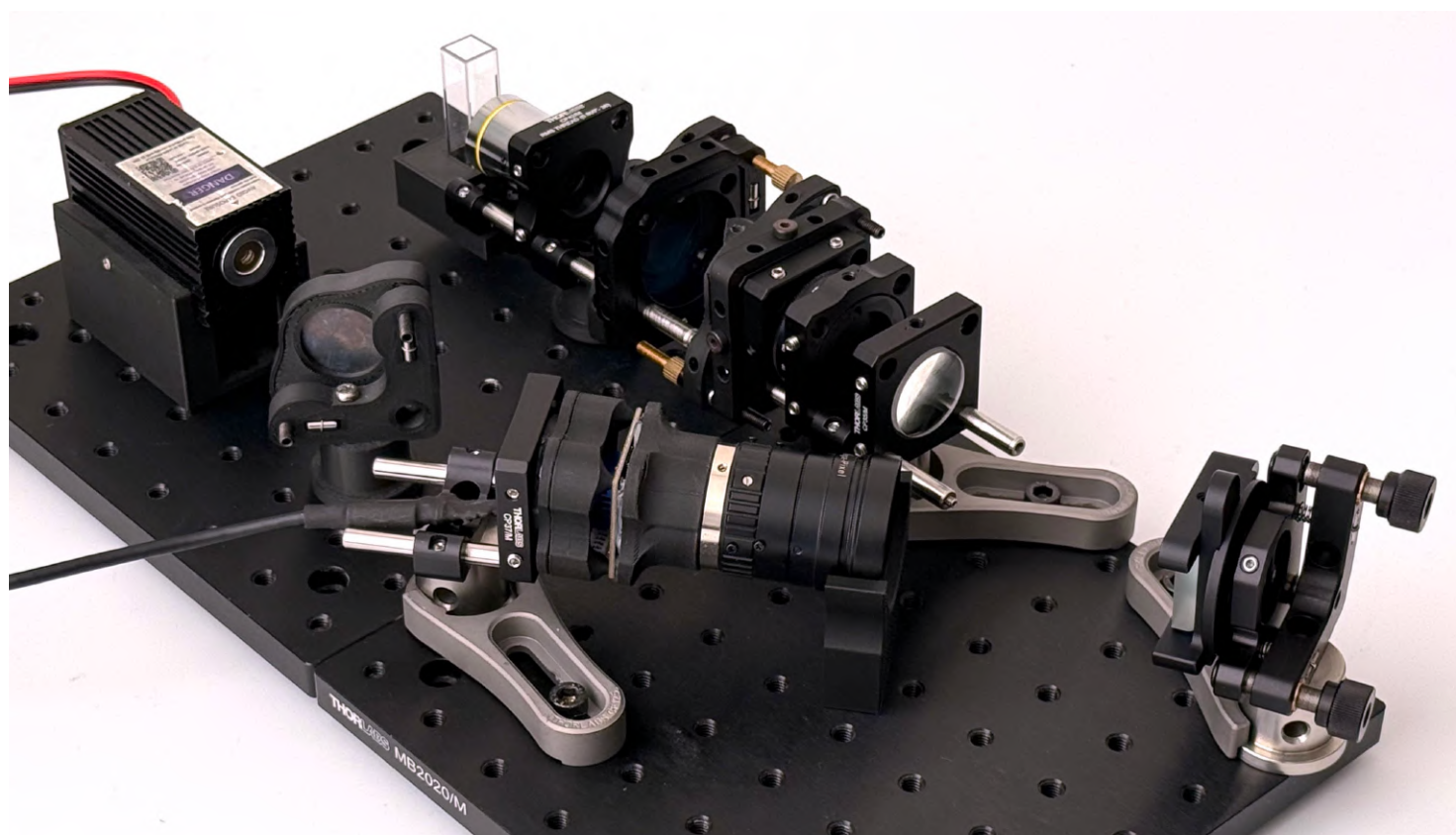


写真4-5 光学定盤上に構築したラマン分光計の実験セットアップ

4.3.5. 試作した分光計による計測

試作機の評価に際しては、イソプロピルアルコール（IPA）の特徴的なラマンバンドを測定対象とした。使用したCMOSセンサーモジュールは露光時間を最大10秒まで延長可能であった。石英セル内に分注したIPA溶液に対して長時間露光した計測結果を図4-18に示す。背景ノイズの影響を低減するために非対称最小二乗基線補正（ALS）によりベースラインを補正すると、微弱なラマンピークが確認できた。

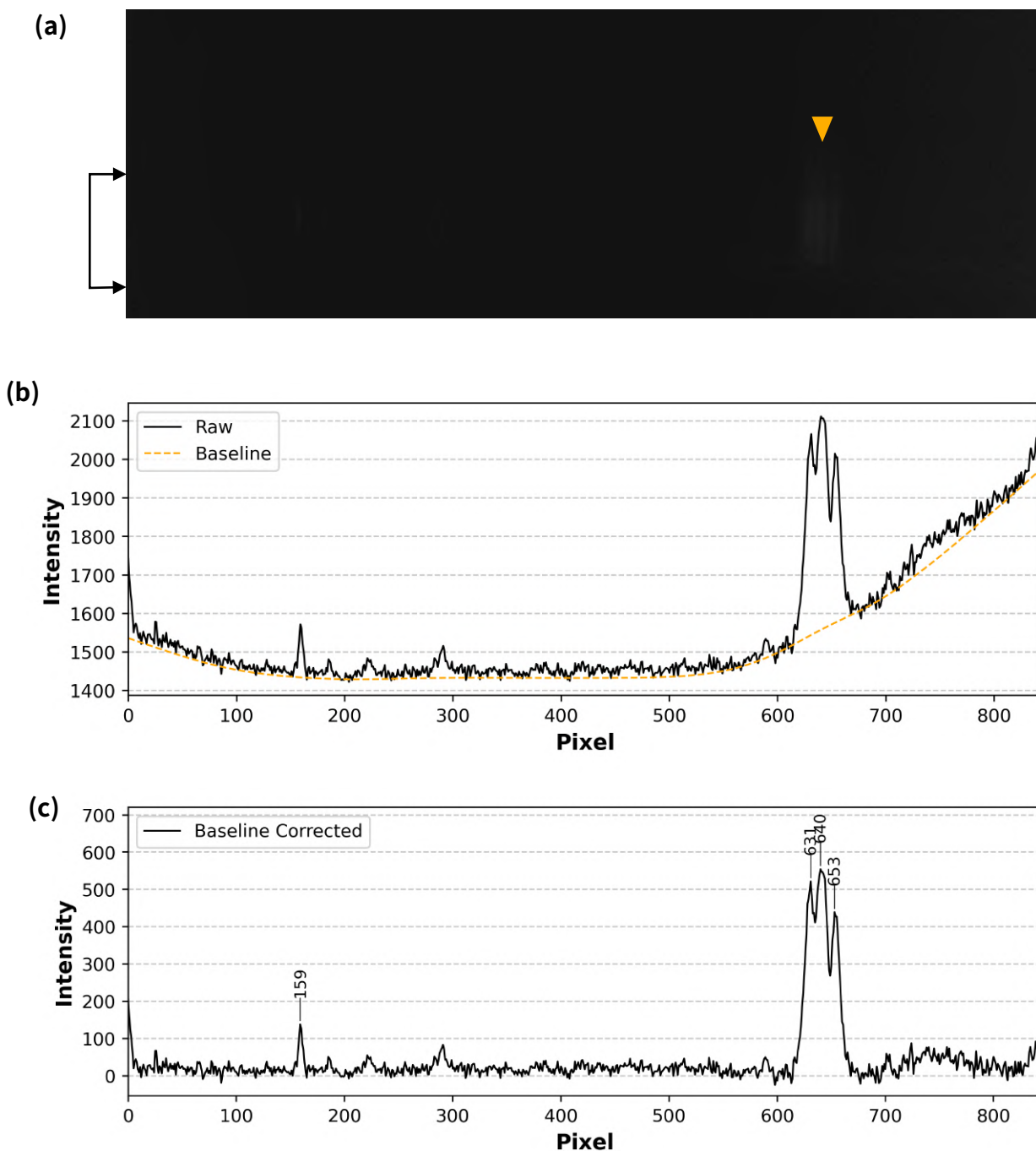


図4-18 試作機によるIPAの計測結果

(a) イメージセンサーで取得したIPAのレーザー誘起ラマン散乱の分光像、10秒間の露光。▲部分に回折格子によって分離された輝線がわずかに可視化されている。画像左右の2つの両端矢印で表される矩形はbおよびcの強度分布プロファイル抽出領域を示す。

(b) aから得た信号の強度分布。黄点線はALS法によって推定される基線。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

(c) bを基線補正したもの。ピーク上の数値はピクセル位置を示す。機械的なピーク検出を行っているため、肉眼上ピークと考えられるものでも閾値以下の場合には数値が表示されていないことに注意。

同様の計測を複数の異なるイメージセンサーを用いて行った（図4-19）。センサーごとに感度特性や波長域ごとの量子効率が異なるため、得られるスペクトルのベースライン形状や各ラマンバンドの相対強度は顕著に変化することが明らかとなった。またベイヤーフィルターの有無は波長ごとの透過特性にも影響を与え、カラーセンサーとモノクロセンサーの比較ではノイズ特性や感度分布に差異が見られたが、ベイヤーフィルターが無いことによる感度の向上は見られなかった。一般にメーカーが公表するスペクトル感度特性や暗電流ノイズの定量値は指標として有用だが、微弱光計測の実際において、数値から単純にS/N比や感度を見積もることは困難であり、最終的には対象波長域や測定条件に応じて実測を経た最適なセンサー選択が不可欠であることが示唆された。また、計測の利便性から使用するセンサーは1つを除いていずれもUSB video class（UVC）対応のものを使用した。UVCは利便性は高いものの、露光時間やシャッタータイミングなどのセンサーパラメーターの設定に一部制約があり、センサーの性能を最大限に引き出せていない可能性がある。

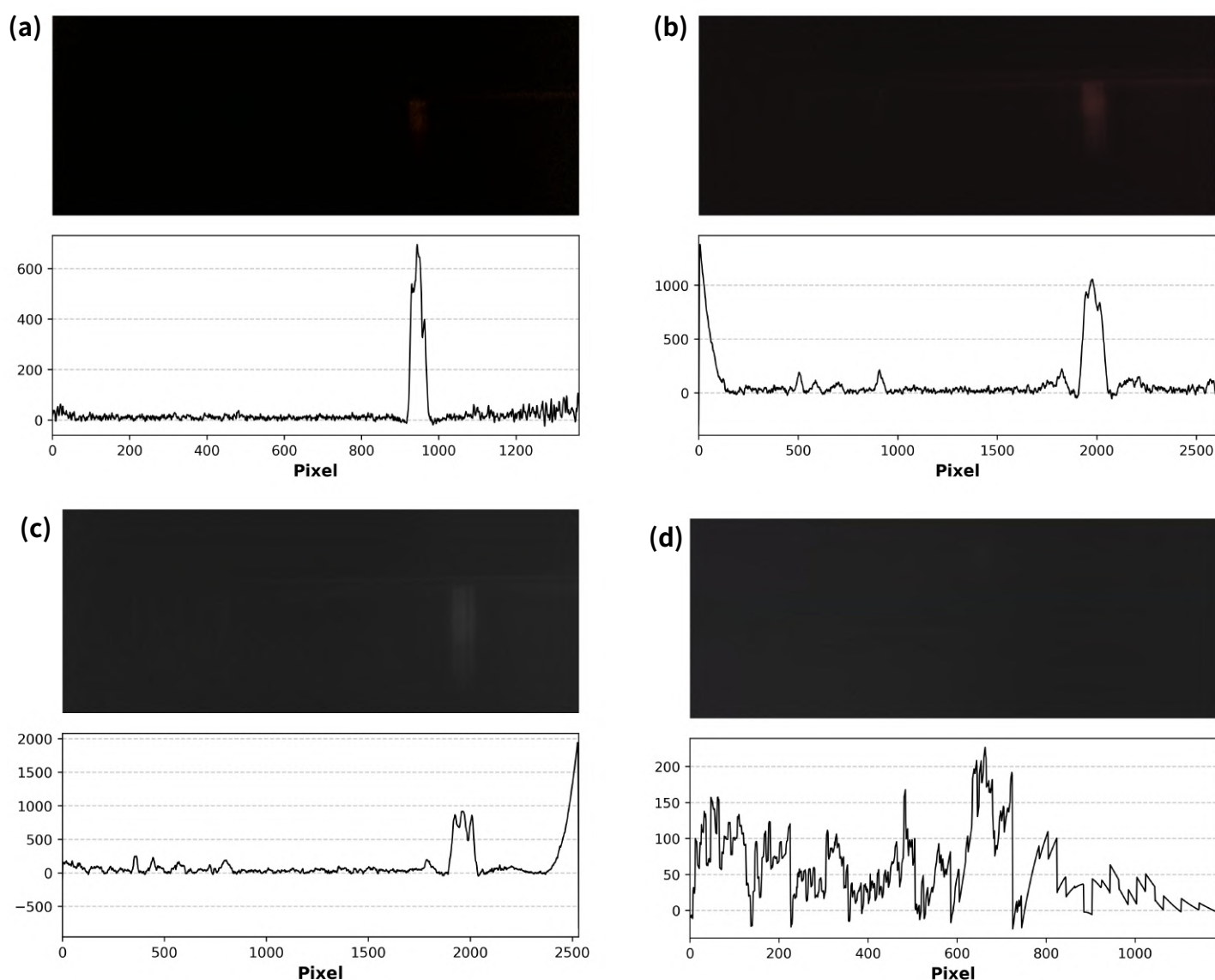


図4-19 試作機によるIPAの計測結果

それぞれの上段はイメージセンサーで取得した実際の画像、下段は画像から得られた信号の強度分布を示す。

- (a) IMX334
- (b) IMX274
- (c) OS02C10
- (d) BFLY-U3-23S6M-C

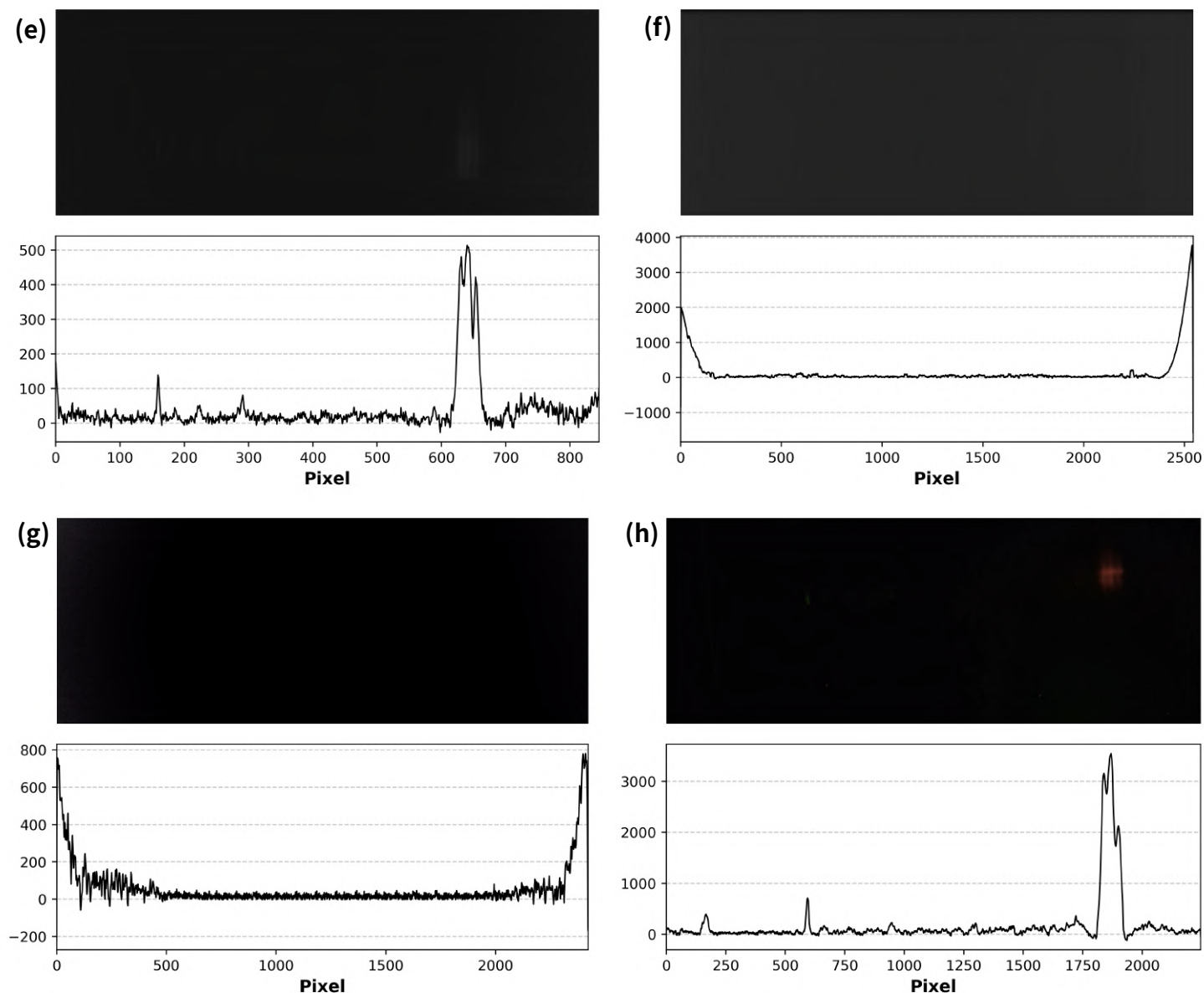


図4-19（続き） 試作機によるIPAの計測結果

それぞれの上段はイメージセンサーで取得した実際の画像、下段は画像から得られた信号の強度分布を示す。

(e) IMC317

(f) AR0144

(g) mt9j003

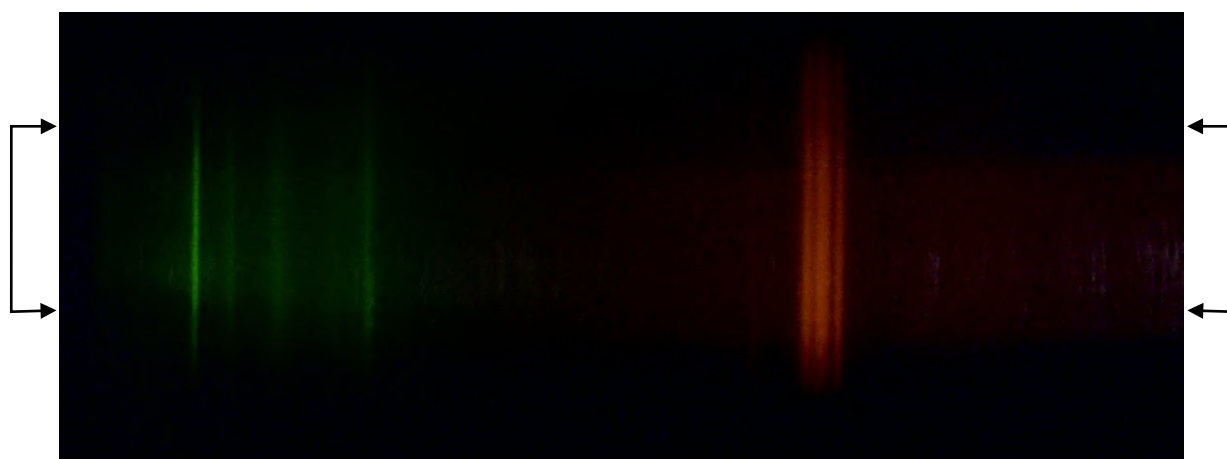
(h) IMX819

最終的に最もS/N比の高いセンサーを使用し（図4-20）、既知のIPAのラマンスペクトル³をこれら既知の輝線パターンと比較すると、良好な整合性が得られていることが確認でき、IPA中に存在する変角振動あるいは伸縮振動由来の複数のピークを鮮明に捉えることが可能であった（図4-20c）。これは開発した分光器が微弱な蛍光シグナルを確実に抽出できる感度と信頼性を有することを示している。また、酢酸やメタノールでも複数の明瞭なラマンピークを取得し、それぞれ既知の酢酸⁴およびメタノールのラマンスペクトルとの整合性が得られていることがわかった（図4-21、22）。いずれも多くの隣接ピーク構造を分離でき、高いスペクトル分解能を保ちつつ十分なS/N比を確保できていることがわかった。

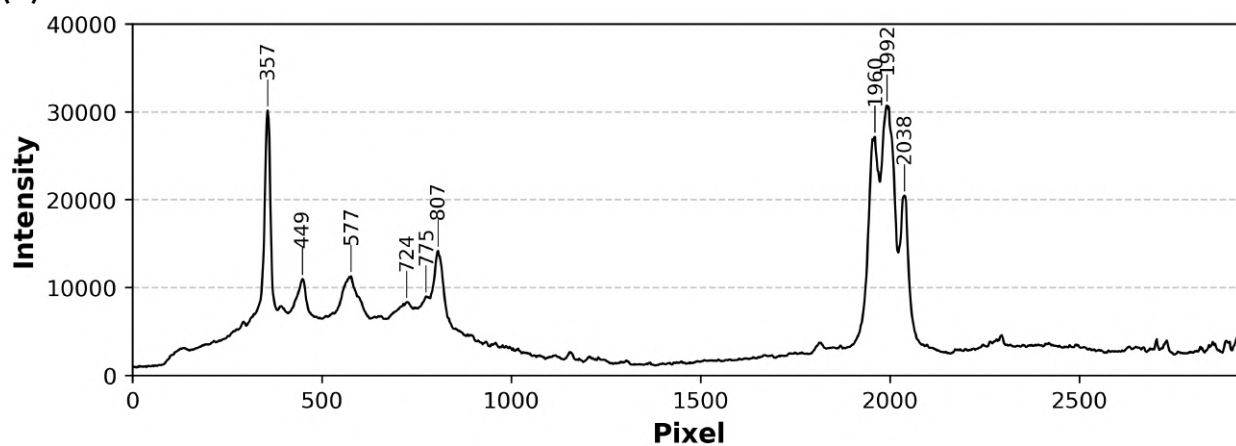
これらの成果から、本装置は高い感度と分解能を兼ね備え、様々な化学種に対して微弱な光学信号を確実に計測できることが示された。ピーク間隔の狭いスペクトルを精度良く分離できることは、複雑な混合

物や生体試料中の微弱シグナル解析において極めて有用である。また、既知の有機化合物スペクトルと比較した結果から、装置の精度を校正できることも可能であることが明らかとなった。

(a)



(b)



(c)

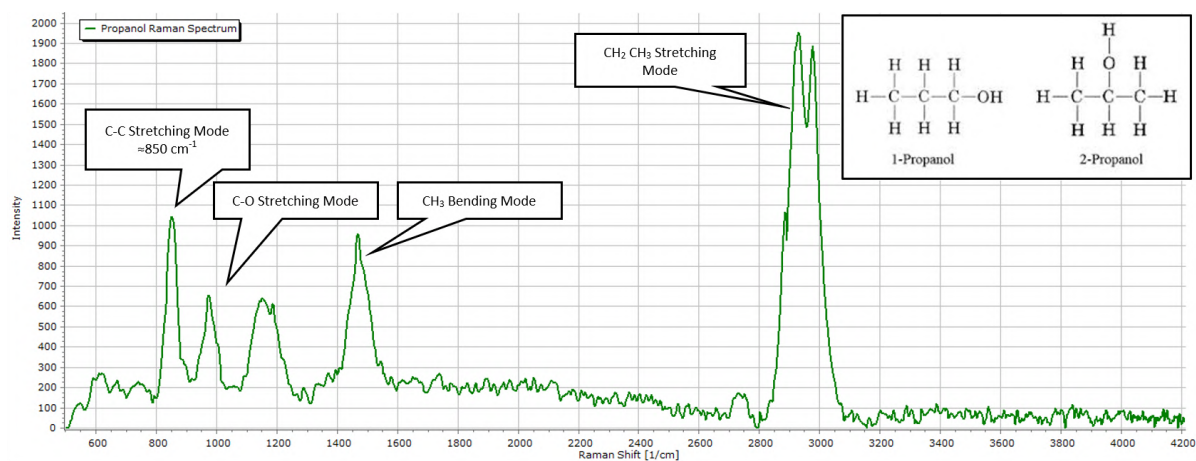


図4-20 試作機によるIPAの計測結果

(a) イメージセンサーで取得したIPAのレーザー誘起ラマン散乱の分光像。回折格子によって分離された輝線が可視化されている。画像左右の2つの両端矢印で表される矩形はbの強度分布プロファイル抽出領域を示す。

(b) aから得た信号の強度分布。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

(c) IPAのラマンスペクトル（文献2より引用）。bで示した観測結果と整合する輝線パターンが確認される。

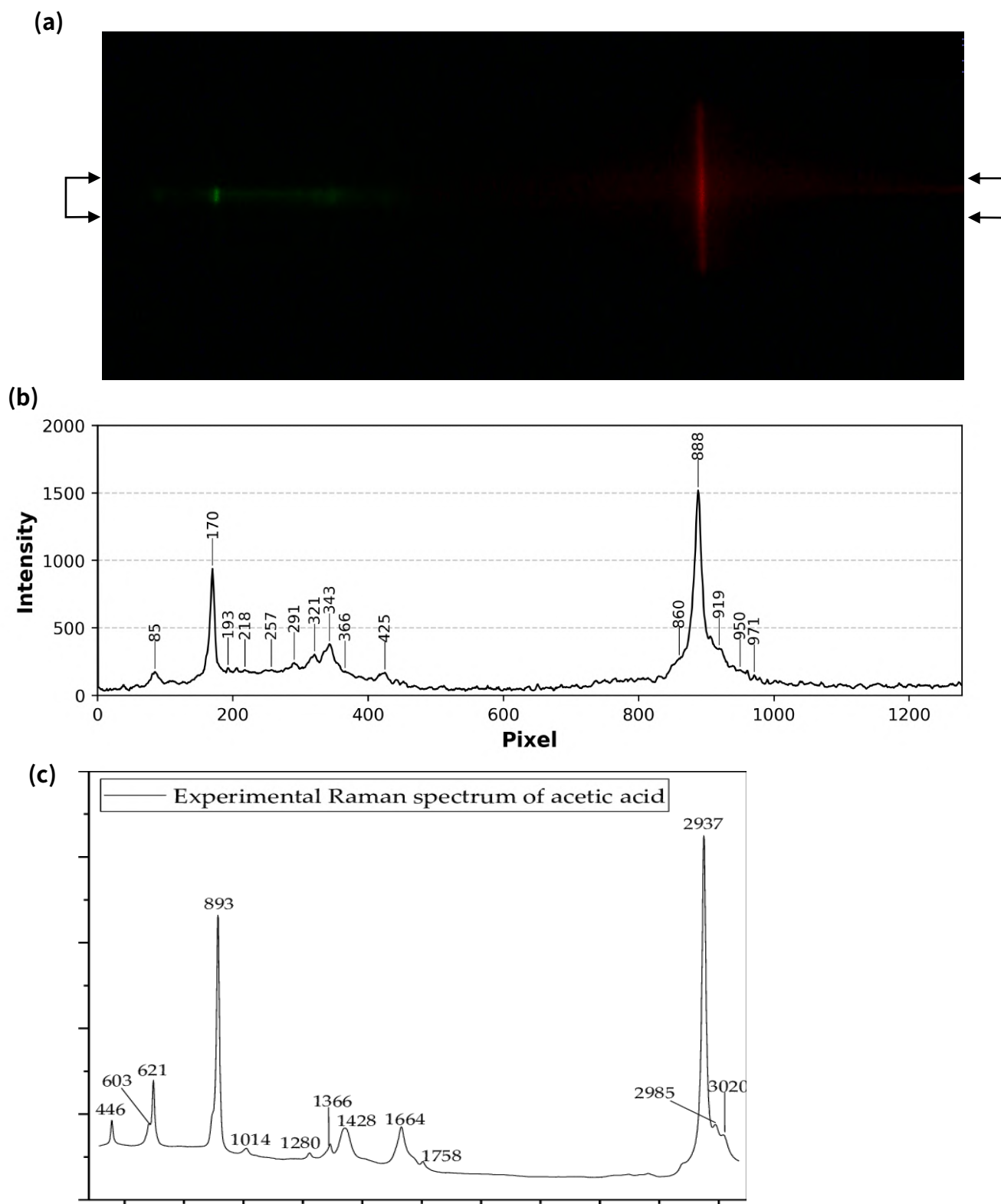


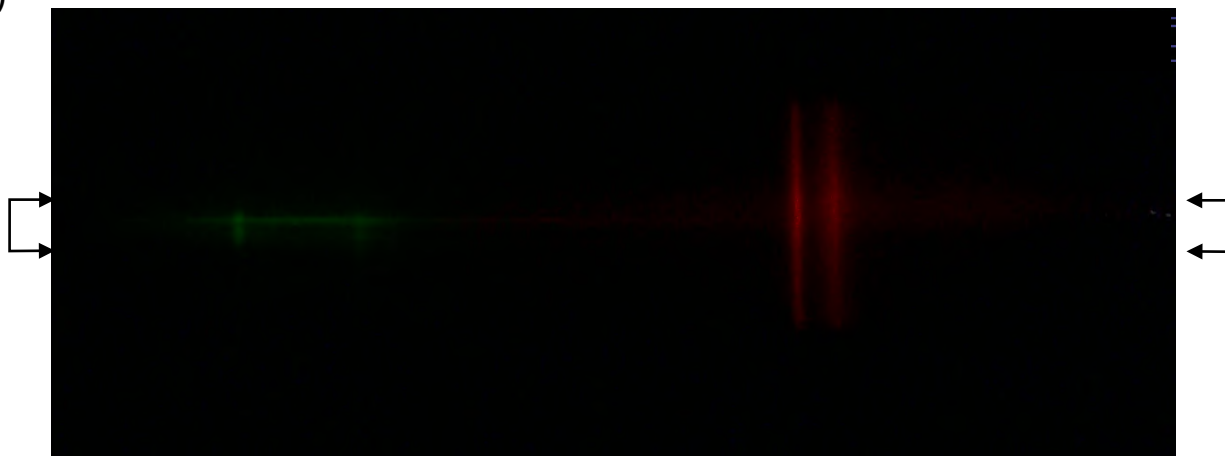
図4-21 試作機による酢酸の計測結果

(a) イメージセンサーで取得した酢酸のレーザー誘起ラマン散乱の分光像。回折格子によって分離された輝線が可視化されている。画像左右の2つの両端矢印で表される矩形はbの強度分布プロファイル抽出領域を示す。

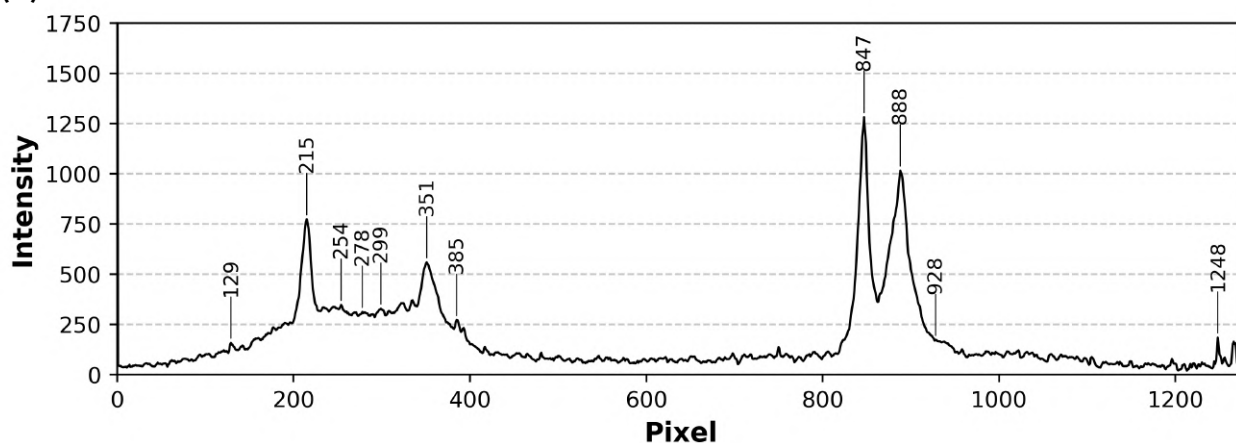
(b) aから得た信号の強度分布。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

(c) 既知の酢酸のラマンスペクトル（文献3より引用）。bで示した観測結果と整合する輝線パターンが確認される。

(a)



(b)



(c)

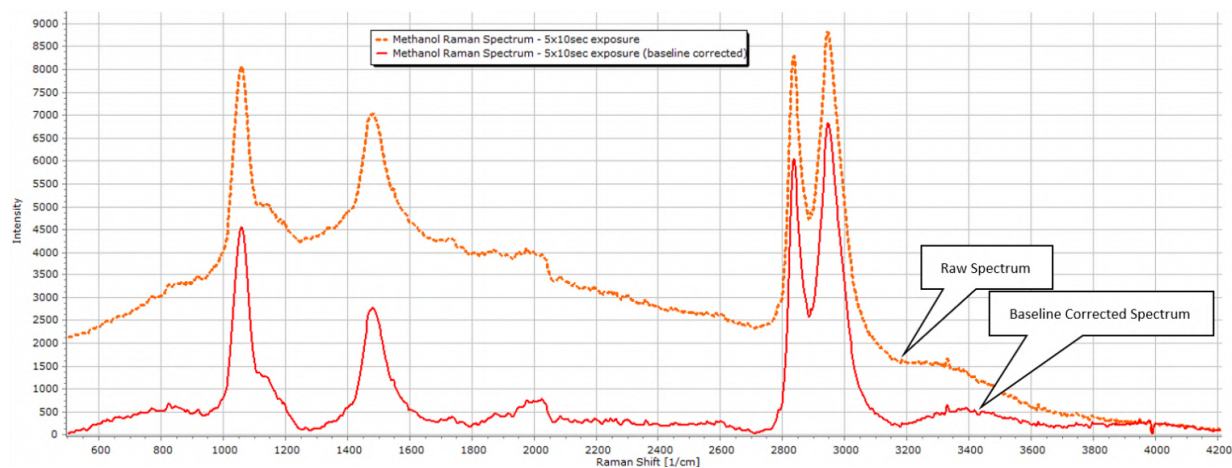


図4-22 試作機によるメタノールの計測結果

(a) イメージセンサーで取得したメタノールのレーザー誘起ラマン散乱の分光像。回折格子によって分離された輝線が可視化されている。画像左右の2つの両端矢印で表される矩形はbの強度分布プロファイル抽出領域を示す。

(b) aから得た信号の強度分布。縦軸は信号強度、横軸は画面上でのピクセル位置、プロット上部の数値はピークのピクセル位置を表す。

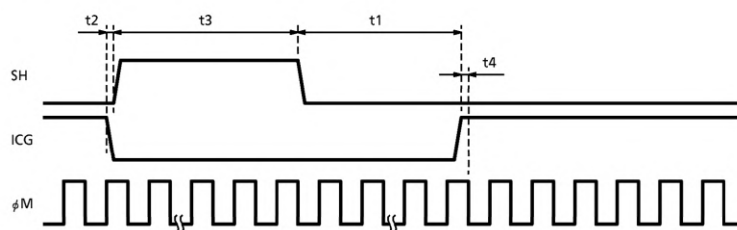
(c) メタノールのラマンスペクトル（文献2より引用）。bで示した観測結果と整合する輝線パターンが確認される。

4.3.6. センサーの設計

前節までの検出系開発において、UVC対応の2次元センサーを用いた分光計システムに関する特性評価を行い、その際に感度や性能に関するおおまかな限界や特性を理解できた。しかし装置内にセンサーを組み込み、微弱な信号を確実に捉え、高感度かつ柔軟な制御を実現するためには、センサードライバー自体を独自に設計し、露光時間やシャッタータイミングなどの各種動作パラメーターを自由に操作できる必要がある。本節では、より自由度の高い検出を実現するために、1次元ラインセンサーの設計を行った。センサー選定に際しては、コストや入手性、分光器への採用事例が多いことを考慮してCCDセンサーモジュール（TCD1304⁵、東芝、日本）を使用することとした（使用部品の型番については補遺8.3.5.参照）。このセンサーシステムの制御および読み出しをするため、32ビットマイクロコントローラーを用いて信号生成・取得・通信を処理するセンサーモジュールの開発を行った。センサー制御信号の生成とセンサーデータの読み出しを一元管理し、計算機との双方向シリアル通信を可能にするとともに、得られたセンサー値を表示し、露光時間やゲインといった各種動作パラメーターを逐次変更できるプログラムを開発した。

センサーの制御においては、精緻なタイミング管理が極めて重要であり（図4-23）、安定した動作環境を得るために繰り返しの調整を要した。最終的に、複数のハードウェアタイマによってセンサーの動作を制御し、パルス信号の生成と同期を実現する構成となった（図4-24）。Master Clock (ϕM) 信号、積分クリアゲート（Integration Clear Gate, ICG）信号、シャッター（Shutter, SH）信号を独立した3つのタイマで制御して出力し、ヘックスインバーターで波形の整形とスイッチングノイズを低減し、センサーに入力する。同時にセンサーからの出力を、シャッター信号に同期させたアナログデジタル変換（Analog-to-Digital Converter, ADC）信号で制御して読み取る。ADCはダイレクトメモリアクセス（Direct Memory Access, DMA）を介してセンサーデータを連続的に取得し、設定した所定カウント閾値に達すると、得られたデータをバッファに蓄積した上で、Universal Serial Buss経由のシリアル通信（Communications Device Class USB, CDC-USB）によってこれらの測定値を連続的に転送する。加えて、計測条件やカウント値に応じてフラグが管理され、必要に応じて転送条件が満たされた段階で即時にデータを外部へと送出させるフローとした。

TIMING REQUIREMENTS



CHARACTERISTIC	SYMBOL	MIN.	TYP.	MAX.	UNIT
ICG Pulse DELAY	t1	1000	5000	—	ns
Pulse Timing of ICG and SH	t2	100	500	1000	ns
SH Pulse Width	t3	1000	—	—	ns
Pulse Timing of ICG and ϕM	t4	0	20	*	ns

* : You keep ϕM "High" Level.

(Note) : If you use electronic shutter function. t_{INT} (MIN.) = 10 μs

図4-23 TCD1304の制御信号タイミング要件図（文献5から引用）

ICG、SH、 ϕM パルス信号間の同期要件と許容値を示したタイミング図とパラメーター表。

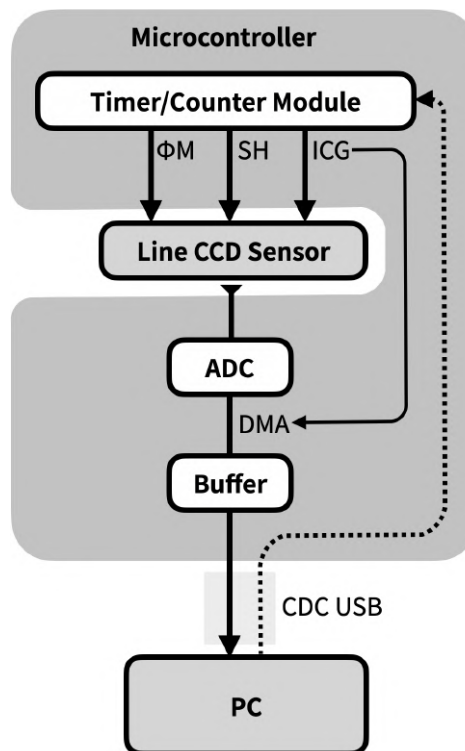


図4-24 センサーのマイコン制御システムとデータフロー図

マイクロコントローラーによるセンサーの駆動制御、データ取得、バッファリング、およびUSB経由でのPCへのデータ転送のフロー図。

マイコンはΦM信号をもとに、ICG信号およびSH信号と同期を取り、CCDセンサーを駆動する。CCDセンサーからのアナログ電圧変化の出力は、マイコンに内蔵されたADCでデジタルデータに変換され、ICG信号に同期したDMAによってマイコン内のバッファに格納される。PCは任意のタイミングでマイコンのバッファ内に蓄積されたデータをシリアル通信で読み出し、可視化する。PC側からはSH信号とICG信号の設定値を送信し、露光時間を変化させる。

4.3.7. 設計したセンサーの試作と駆動、計測

前節で設計したセンサーを実際に実装し、動作確認をした上で計測を行った（写真4-6）。まず、前節で導出した制御信号生成手法に従い、実装したドライバー回路を用いて各制御パルスの正確性と同期性をオシロスコープ上の論理アナライザで確認した（図4-25）ところ、設計通りに各信号が生成され、相互の同期が精密に保たれることが確認された。また、この制御下でセンサーから出力されるアナログ信号をオシロスコープを用いて観察し、設計段階で想定した応答特性に近い形でセンサーが機能していることを確認できた（図4-25a）。

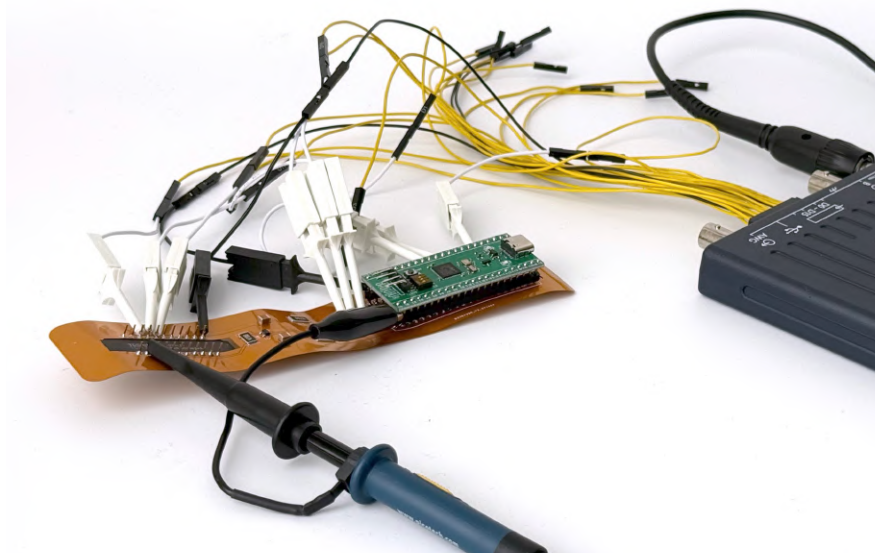


写真4-6 オシロスコープによる動作確認

試作したラインCCDセンサー基板の組み立て後、オシロスコープを用いて各部での制御信号の検証を行った様子。

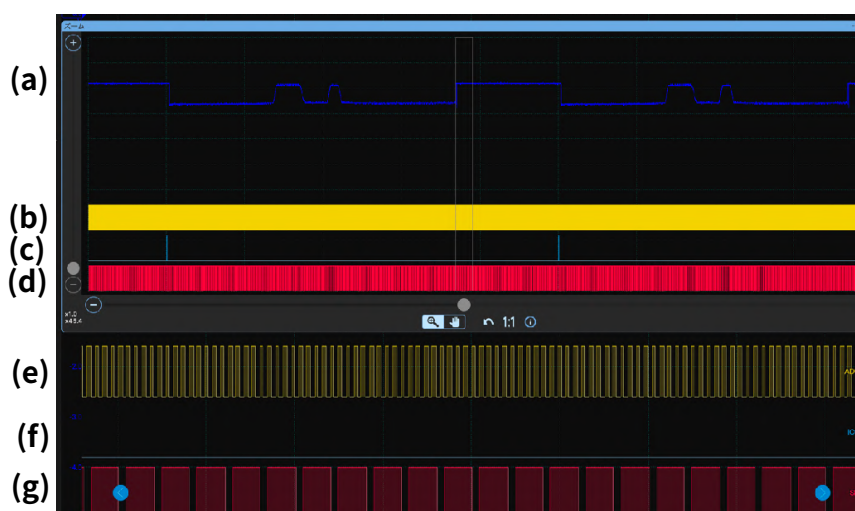


図4-25 オシロスコープによる制御信号の確認とセンサーの出力波形

(a) センサーからの出力波形。ICGのトリガー (c) に合わせて信号が出力されていることがわかる。

(b) ϕM 信号、(c) ICG信号、(d) SH信号

(e) bの拡大図、(f) cの拡大図、(g) dの拡大図。いずれも**図4-23**のタイミング要件をクリアしていることがわかる。

さらに、設計された基板上にセンサーとマイコンを統合し、USB接続されたPC上でリアルタイムにセンサー値を取得し、動作状況を可視化することで、基本的なデータ取得環境が実現できることを確認した（写真4-7、図4-26）。試作したセンサーの性能を、簡易的な分光計環境で評価するため、凹面回折格子を用いた系を構築し動作の確認を行い、センサー出力の表示ができる環境が準備できたことを確認できた（図4-27、写真4-8）。しかしながら、微弱信号計測において安定かつ高精度に検出するには、内部クロックやシャッター制御のさらなる精密化が必要であることが明らかになった。特に高精度なタイマ設定や安定したクロック供給が制御系の信頼性を左右し、シャッター開閉タイミングが不安定になると同期崩れが生じ、ノイズとともに計測精度が著しく低下した。また、USB通信によるデータ取得フローにも課題があることがわかり、安定した転送のためには適切なエラーハンドリングが不可欠であることがわかった。

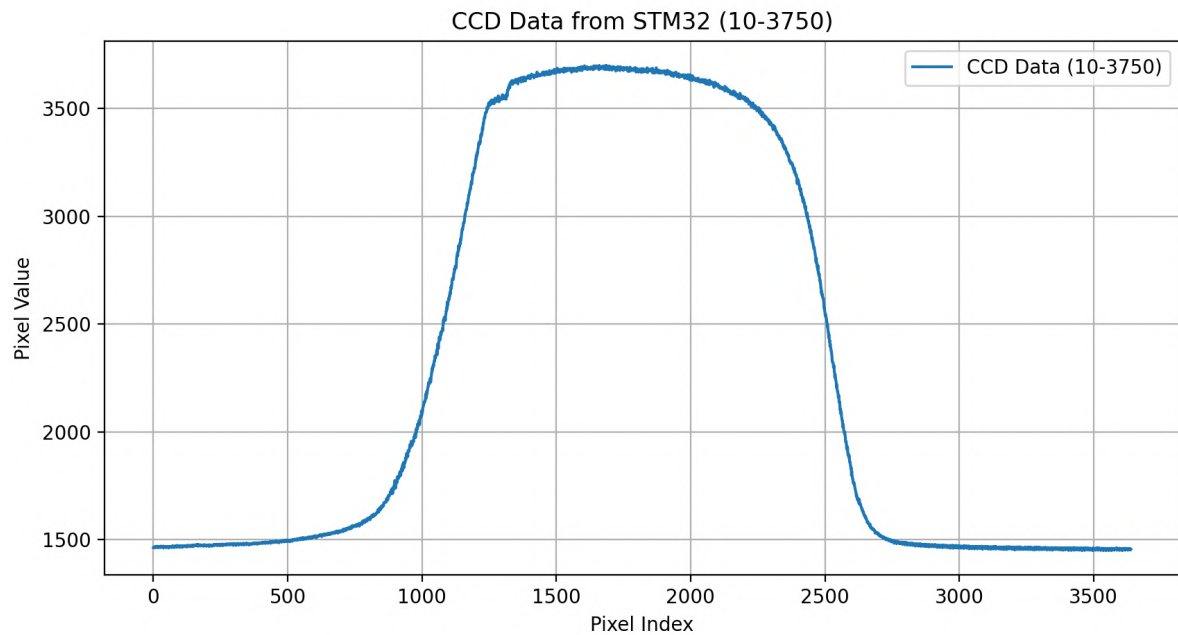


図4-26 PC上でのセンサー値の表示

センサーからの出力信号値をPC上で取得し表示したもの。縦軸はADCによって変換された数値、すなわち信号強度を、横軸はピクセル位置を表す。マイコンの基準電圧の影響で信号値のベースラインが0ではないことに注意。

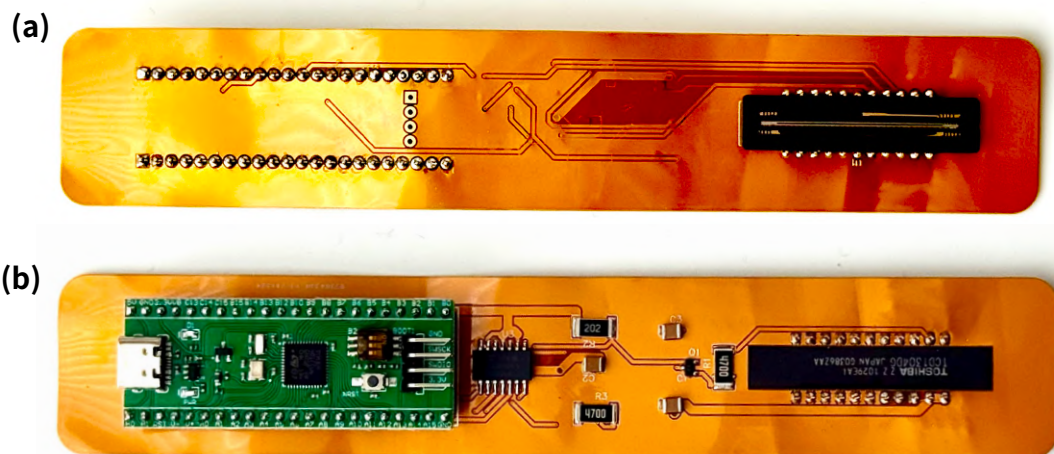


写真4-7 試作したセンサーシステム

センサーおよびマイコンと接続された駆動回路基板の全体像。

(a) センサー設置面、(b) 他部品実装面

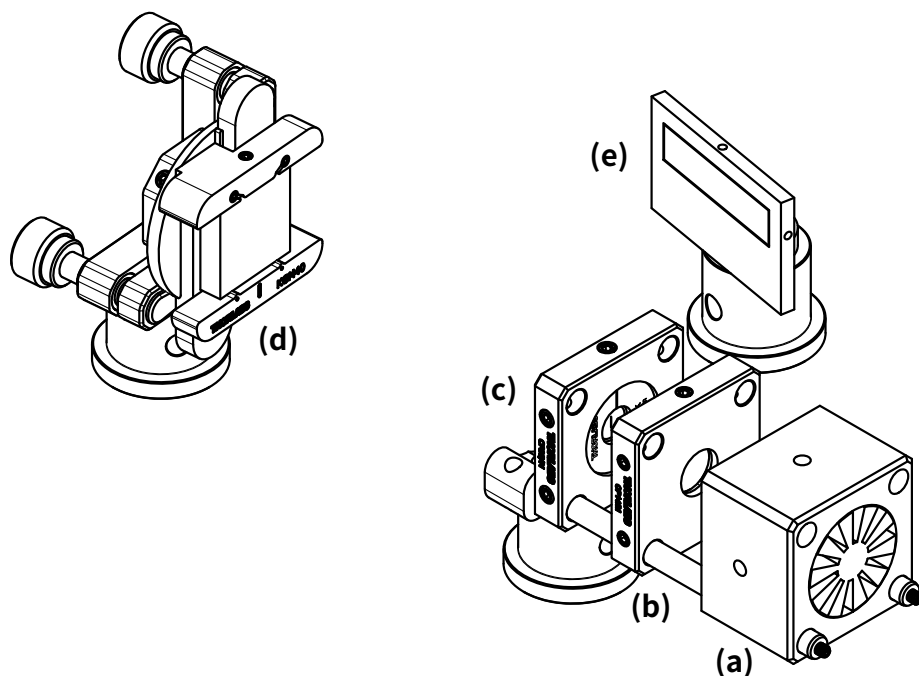


図4-27 試作したセンサーを組み込んだ分光計の光学系構成図

光学系の概略図。LED光源からの光をレンズで集光し、スリットを通して凹面回折格子で分光し、試作したセンサーで検出する構成とした。

(a) LED光源、(b) コリメーターレンズ、(c) 光学スリット、(d) 凹面回折格子、(e) 試作したセンサ（回路、マイコンは図中に表示していない）。

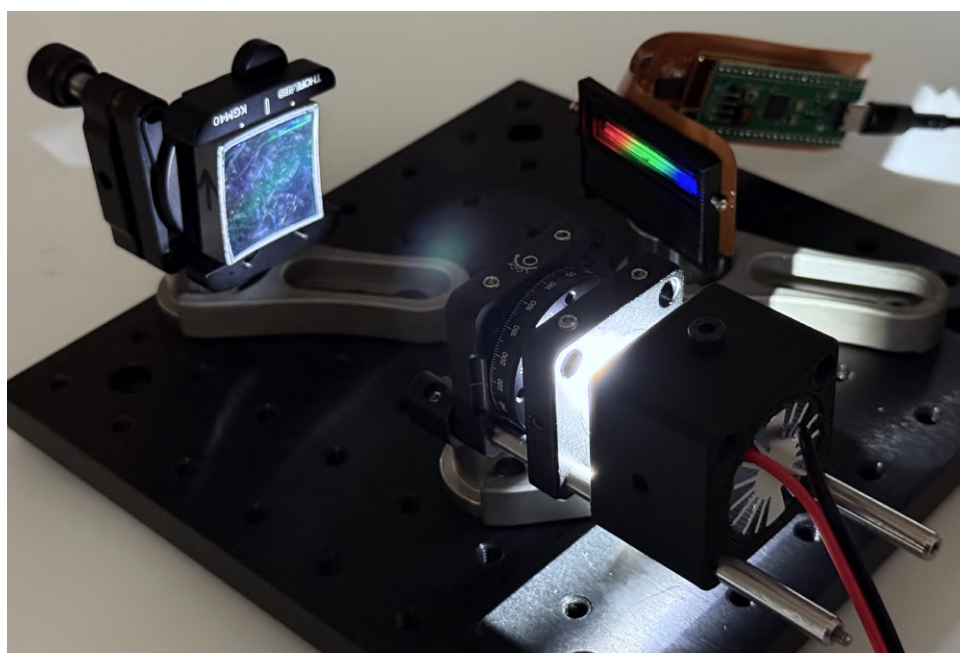


写真4-8 試作したセンサーの分光計への組み込み実装写真

図4-27を光学定盤上に実装した分光計。画面右上のセンサ素子上に、スリットの分光像が虹色の帯として結像している様子が確認できる。分光像が視認できるよう、撮影時のみLEDの出力を一時的に上げている点に注意。

以上の結果より、ラインセンサーシステムを基盤とした高感度な分光計測が可能であることは示されたものの、さらなる高速動作や大量データのリアルタイム処理に対応するためには、制御系とデータ処理系の両面で改良が必要であることが明らかとなった。タイミング制御および通信速度を一層向上させ、安定性と汎用性を強化することで、微弱光の計測において実用的な性能を発揮する包括的なセンサー系を確立していく必要がある。

4.4. まとめ

本章では、菌種同定に最適化した蛍光分光計測装置の開発について、理論的検討から実践的応用への展開を試みた。これまでの理論的検討を基に、実用化の可能性と技術的課題を明確にするため、試作機の設計プロセス、製作過程、および評価結果について論じた。

まず、前章の解析結果から、LEDを分光せずに直接励起光源として用いても十分な精度で菌種同定が可能な装置を製作できる可能性が示唆されたため、試作機に用いる光源の選定と最適化を行った。市場で入手可能な36種類のLEDについて、調達可能性や出力特性を考慮しつつ波長特性の解析を行った。各LEDの発光スペクトルを効率的に近似でき、前章で用いた200 nmから600 nmの波長域をカバーしていることを確認した。また、LEDを励起光源として用いる場合、その発光特性を考慮した重み付けが合成蛍光スペクトルの再現に必要なことをシミュレーションで確認した(4.1.1.)。この知見に基づき、ベイズ最適化を用いて菌種同定の精度を最大化する最適なLEDの組み合わせを探索した。その結果、4つ以上のLEDを組み合わせることで診断精度が高い値で安定することが明らかになり、試作装置には少なくとも4つのLEDを含む光源設計が望ましいと考えられた(4.1.2.)。

光源と光学系の開発では、まず単一LEDを用いた試作機を製作し(4.2.1.)、基本的な計測データを得た(4.2.2.)。この試作機では、励起光の効率的な照射と蛍光信号の高精度な収集を重視した光学系を設計し、測定結果から細菌試料の蛍光特性を十分に捉える能力を有することを確認した。しかし、シミュレーションと実測値の間には450–500 nm領域で一部乖離が見られ、検出器の波長感度特性などが影響している可能性が示唆され、さらなる検証が必要であることが分かった。

実際に本格的にサンプル数を増やしての計測には、まだ装置自体の改良が必要であり、現時点では至っていない。しかし、これらの成果は理論と実践の橋渡しとして重要な意義を持ち、実用的な菌種同定装置の開発に向けた方向性を確認することができた。菌種同定のための蛍光スペクトルを高精度で測定できる性能を有する試作機の作成が可能であることが示された。また、機械学習を用いたシミュレーション結果と実測値の整合性についてはさらなる検証が必要であるものの、モデルを活用した装置設計が有効であることが示唆された。さらにこれらの試作を繰り返す過程で、必要な感度や電子部品、光学部品の選定、装置の設計などを実際に行うことで、設計時に意識すべき要素や必要とされる事項について確認することができた。

本研究における試作開発は、まず基礎的なシミュレーションと単一LED試作機による原理検証を初期段階として位置づけ、それを踏まえて複数LEDを用いた励起系の構築や分光計の設計に至る中間段階で装置の信頼性や測定精度を向上させ、最終的に高スループットかつ高精度な菌種同定を実現する実証段階へと進むことを目標としていた。本章での試作や評価はこの中間段階までの部分に該当し、研究全体の開発としてはおよそ5から6割程度が完了した状況であるが、まだ最終的な信頼性や運用性、量産化時のコスト要件などの課題を解消する必要がある。引き続き、試作機を用いたさらなる比較試験や連続的な微弱光計測への適用検証を経て、実証段階の確立を図り、最終目標である実用的な菌種同定装置の完成を目指す。

¹ Thorseth A. Characterization, Modeling, and Optimization of Light-Emitting Diode Systems. Technical University of Denmark; 2011.

² 米国国立標準技術研究所「Strong Lines in the Spectrum of Neon (Ne)」 : <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/neontable2.htm> (2025/1/18/アクセス) .

³ PhysicsOpenLab「Raman Spectra of Alcoholic Molecules」 : <https://physicsopenlab.org/2022/01/20/raman-spectra-of-alcoholic-molecules/> (2024/12/7/アクセス) .

⁴ Wan F, Du L, Chen W, Wang P, Wang J, Shi H. A novel method to directly analyze dissolved acetic acid in transformer oil without extraction using raman spectroscopy. Energies. 2017;10(7):967.

⁵ 東芝デバイス&ストレージ株式会社「TCD1304DG」 : <https://toshiba.semicon-storage.com/jp/semiconductor/product/linear-image-sensors/detail.TCD1304DG.html> (2024/12/7アクセス) .

5. 事業実践と起業に向けた環境構築

2章から4章で細菌の自家蛍光特性および診断精度を向上させるための分光分析手法の有効性を検討し、理論的および実験的にその診断可能性を論じ、試作機によるpoint-of-careデバイスの実現可能性についても検討してきた。これらの研究は臨床現場における細菌の迅速同定および抗菌薬感受性試験に新たな診断技術の可能性を示し、感染症管理の現場における機器開発の意義を裏付けるものである。しかし技術的に優れた診断手法を臨床や産業分野で実用化するためには、学術的成果を基盤とした実践的な事業展開が不可欠である。Woolf（2008）は、基礎研究が臨床応用を経て実社会で利用されるまでの過程において、科学的発見とビジネス戦略の統合が重要であると指摘している¹。さらに、Drainら（2014）は、point-of-careの医療診断技術の実用化に際して「ASSURED」基準（Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, Deliverable to end-users）を提示し、技術革新に加えて、実際の使用環境に適応した製品設計、コスト管理、持続可能な供給チェーンの構築が不可欠であると報告している²。技術の実用化における課題は診断の精度や速度の向上などの学術面のみではなく、効率的で持続的な製品供給体制の構築、規制対応の戦略策定、多様な顧客ニーズを的確に捉えるマーケティング施策の整備といった事業面にも多く存在し、これらに対する総合的なアプローチが必要である。

本章では細菌迅速検査デバイスの市場展開と実用化に向けた戦略を立案し、事業環境の構築について論じる。まず、市場分析を通じて細菌迅速検査の需要と潜在的な競争力を評価し、既存の競合技術や将来の技術開発の方向性に基づく競争戦略を検討する。次に、収益予測やスケジュールの確立、パートナーシップ構築といったビジネスプランを策定し、資金調達と運用管理の最適化を図る。また、国際市場への展開に不可欠な法規制対応についても触れ、承認プロセスとリスク管理の手法を具体的に考察する。さらに、研究開発費の確保やインキュベーションプログラムの活用を通じて、起業支援の可能性を追求し、持続可能な事業運営を実現するために自身が実施してきた取り組みについて論じる。

5.1. 市場分析

本節では、市場分析を通して製品のポテンシャルを評価し競争環境や成長因子を踏まえた市場参入戦略について検討する。

5.1.1. 細菌迅速検査市場の概要

細菌迅速検査市場は、医療診断分野において古くから存在する1つのセグメントであり、臨床現場からは感染症の迅速かつ正確な診断が常に求められている。この市場は抗菌薬耐性菌（AMR）の増加や新興感染症の出現³、公衆衛生上のニーズの高まりなどを背景に、医療以外の領域も含めた多岐にわたる分野で需要が拡大している⁴。特にCOVID-19パンデミックの経験を踏まえ、世界的な感染症対策の強化や個別化医療の進展に伴う精密診断の需要増加が、市場のさらなる発展を促している⁵。

市場規模は緩やかに拡大しており、2020年時点で世界全体で見ると約40億ドル程度と推定され、年平均成長率は2～3%程度で成長を続けている（図5-1c）⁶⁻⁷。地域別では北米と欧州が市場をリードしており、高度な医療インフラと研究開発投資がその背景にある。一方、アジア太平洋地域、特に中国とインドでは、人口増加と医療ニーズの高まりにより、将来的に高い成長率が見込まれる。

主要な企業として、bioMérieux SA、Becton, Dickinson and Company、Thermo Fisher Scientific、Danaher Corporation、Abbott Laboratories、Roche Diagnosticsなどが市場を牽引している（5.1.3. 参照）。これらの企業は高度な技術力とグローバルな販売ネットワークを有し、継続的な研究開発投資や戦略的買収を通じて、市場シェアの拡大と技術革新を図っている。

市場の課題としては、検査の精密化・高度化に伴うコストの増加や、各国規制当局による厳格な承認プロセスの導入などが挙げられる。特に米国食品医薬品局（FDA）や欧州の医療機器規則（Medical Device Regulation: MDR）などによる認証の取得は、市場参入の障壁となり、グローバル市場での競争力を左右する重要な要素である⁸。一方、デジタルヘルスとの融合や新興市場の開拓、パーソナライズド医療の進展など、新たな機会も存在する。革新的な技術を持つスタートアップ企業の参入も活発化してお

り、特定のニッチ市場や新技術の応用に焦点を当て、大手企業との提携や独自の市場開拓を進めている。これらの新興企業は、市場に新たな動きをもたらし、競争を促進している。結論として、細菌迅速検査市場は、技術革新と公衆衛生上のニーズにより、持続的な成長が期待される分野の1つであると評価できる。

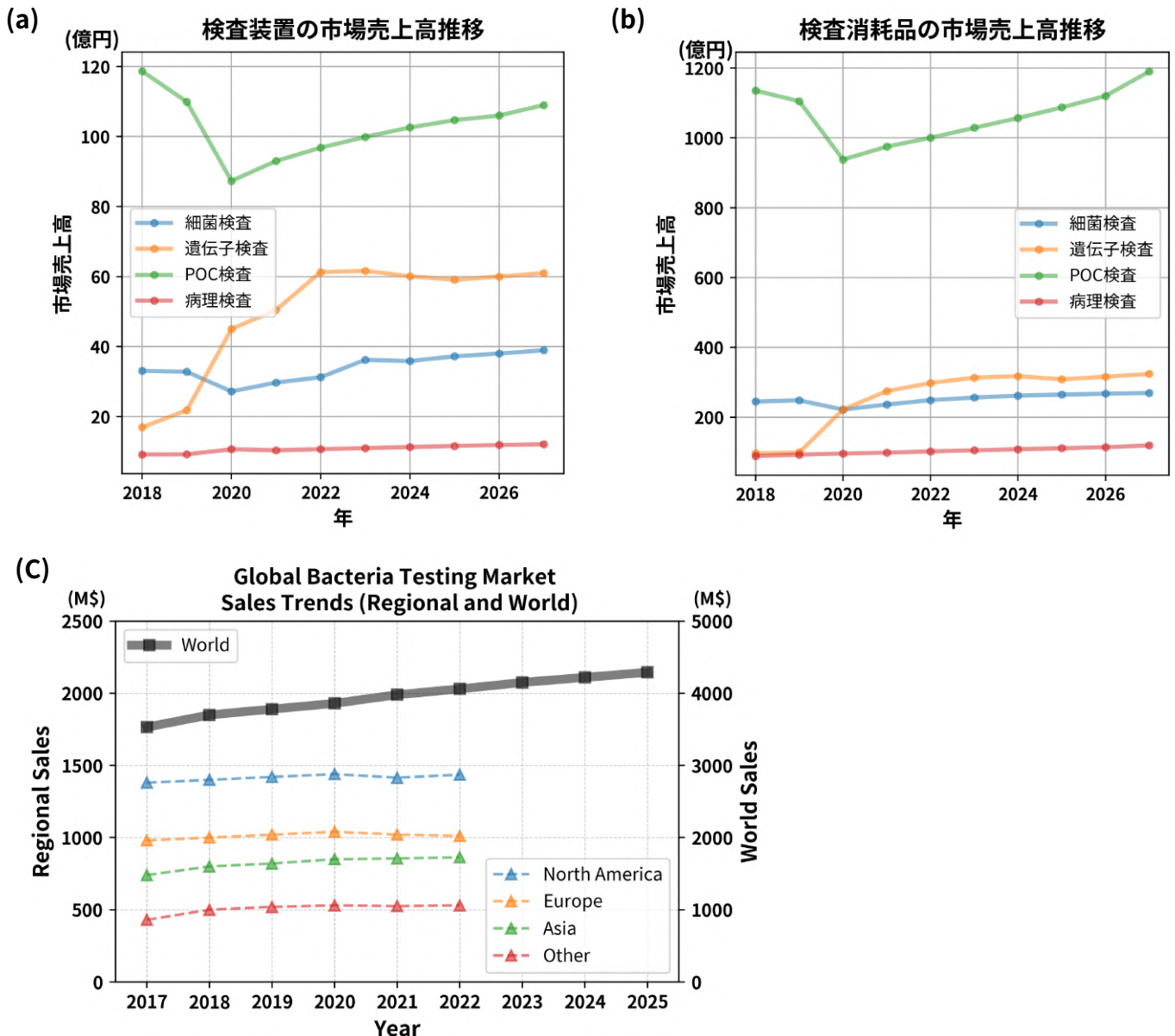


図5-1 検査装置と検査消耗品の品目毎の市場売上高の年次推移

縦軸は売上高、横軸は年次を表す。文献6、7からデータを抜粋。

(a) 検査装置の国内市場売上高の年次推移。2024年以降の数値は予測値。

(b) 検査消耗品の国内市場売上高の年次推移。2024年以降の数値は予測値。

(c) 検査装置と消耗品を合わせた全体の、世界および地域別市場売上高の年次推移。世界全体の売上高は2024年以降の数値は予測値。地域別売上高は、出版元の編集方針の転換によって2023年以降の統計データが入手できなかった。

5.1.2. 市場動向と成長要因

細菌迅速検査市場は技術革新とグローバルな健康ニーズの変化に伴った進展と成長を遂げており、背景にはいくつかの重要な市場動向と成長要因が存在する。

まず、技術革新の加速が市場の主要な動向として挙げられる。主要な技術として、PCRやLAMPなどの分子診断技術、MALDI-TOF MSによる質量分析技術、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイがある。これらの技術革新により、検査の迅速化・高精度化が可能となり、市場の拡大を後押ししている。さらに、AIと機械学習の統合、ナノテクノロジーの応用、CRISPR-Cas9などの新技術の導入により、検査の精度向上と多機能化が図られている⁹。次に、point-of-care検査の普及も顕著である。医療の分散化と患者中心のケアの重視に伴い、ベッドサイドや外来、さらには家庭での迅速検査の需要が高まっており、携帯型デバイスの進化により現場での即時検査が可能となっている¹⁰。また、デジタルヘルスとの統合も進行中である。クラウドベースのデータ管理システムや遠隔医療プラットフォームとの連携により、検査結果の即時共有や遠隔診断支援が実現しつつある。これにより、医療リソースの効率的な活用と地理的な制約を超えた専門的知見の提供が促進されている¹¹。さらに、規制環境の変化も市場に影響を及ぼしている。品質管理やデータセキュリティに関する要件が厳格化しており、これらの基準を満たす製品開発が求められているが、中小企業の新規参入の障壁ともなっている¹²。一方、個別化医療の進展により、患者個々の遺伝的背景や微生物叢を考慮した精密な診断と治療方針の決定が求められ、それに対応した高度な検査システムの需要が増加している¹³。

市場が成長する要因としては、世界的な感染症の増加と抗菌薬耐性（AMR）の拡大が大きな影響を与えている。新興・再興感染症の出現や国際的な感染症拡散リスクの増大により、迅速かつ正確な細菌検査の需要が高まっている。特にCOVID-19パンデミックを契機に、感染症対策における迅速診断の重要性が再認識されている。AMRに対しては、不適切な抗生物質使用を抑制し、適切な治療を迅速に開始するために、細菌の同定と薬剤感受性試験の迅速化が強く求められている。また医療費削減の社会的要請も成長を後押ししている。先進国を中心に医療費の増大が社会問題となる中、早期診断による入院期間の短縮や適切な抗生物質使用による医療資源の効率的利用が重視されている¹⁴。迅速検査の導入により、これらの課題に対応し、医療経済的な利点を提供することが可能となると考えられる。さらに、医療インフラの整備と経済成長が進むアジア太平洋地域、特に中国やインドでは、高度な医療診断技術への投資が増加している¹⁵。消費者意識の向上と予防医療への関心が高まり、セルフケア製品の普及が進んでいる点も市場成長の要因である¹⁶。

以上の市場動向と成長要因により、細菌迅速検査市場は今後も持続的な成長が見込まれる。特にAIとの統合、point-of-care検査の拡大、デジタルヘルスとの連携が市場の主要なトレンドとなることが予測される。また、新興国市場の開拓や環境配慮型製品の開発も成長戦略の重要な要素となると考えられる。

5.1.3. 競合企業

細菌迅速検査市場は、多数のグローバル企業が競合する高度に競争的な環境である。その主要な競合企業として次のような大企業が占めており、豊富な研究開発資源と幅広い製品ポートフォリオを持つためグローバル市場で強い影響力を有している。

- bioMérieux：微生物検査の専門企業であり、VITEK®システムは細菌同定と抗菌薬感受性試験を自動化し高い精度と効率性を実現している¹⁷。
- Becton Dickinson：BD BACTEC™血液培養システムやBD MAX™システムなど幅広い製品ラインナップを持ち、総合的な感染管理ソリューションを提供できる点を強みとしている¹⁸。
- Thermo Fisher：研究開発と臨床診断の両面で製品を展開している。Applied Biosystems™ Real-Time PCRシステムは遺伝子研究系実験室における大きなシェアを持ち、高感度かつ迅速な病原体検出を可能にしている¹⁹。
- Danaher：Cepheid社の買収により迅速PCR検査市場で強固な地位を築いている。GeneXpert®システムは、簡便な操作性と高速な結果提供を特徴としPOC検査市場で高い評価を得ている²⁰。

- Abbott : ID NOW™プラットフォームを中心に、POC検査に特化した製品開発力と世界的な販売ネットワークが強みである²¹。

競争環境の分析では技術革新と製品差別化が競争の鍵である。各企業は、高度な分子診断や質量分析技術を駆使して新技術の導入や既存技術の改良に注力すると同時に、製品の迅速性、精度、使いやすさ、コスト効率などのユーザービリティでもそれぞれ差別化を図っており、市場に新規参入する場合にはこれらの競合に対して十分に優位なフィールドを探し、そこにフィットしたプロダクトを目指す必要がある(5.1.4.および5.2.2.参照)。

5.1.4. 市場ニーズ、顧客要求、市場参入の機会とそれに伴うリスク

細菌迅速検査デバイスに対する市場ニーズは複数の顧客セグメントによって形成されている。まず、医療機関では、検査結果の即時性と正確性が重要視されている。高スループットシステムや広範囲の病原体を同時に検出し、薬剤耐性情報も含めた詳細なデータを提供するシステムが必要とされる。また検査結果を病院情報システムや電子カルテと統合し、効率的なデータ管理と分析が可能な「検査後まで含めたソリューション」が求められる。

次に、中小規模の病院やクリニックでは、操作が簡便で専門的な訓練を必要としない機器や、限られたスペースに設置可能な小型の機器が求められる。外来患者の診療時間内に結果が得られる迅速な検査も重要であり、初期投資と運用コストのバランスが取れた費用対効果の高いソリューションが必要とされる。そして一般消費者レベルでのpoint-of-care (POC) 検査デバイスに対する需要も増加している。セルフケアや予防医療への関心の高まりに伴い、家庭で簡単に使用でき、迅速に結果が得られる検査デバイスが求められている。使いやすさや安全性に加え、手頃な価格帯で提供されることも重要な要素である。

さらに食品産業では、製品の安全性確保のために迅速かつ信頼性の高い細菌検査が必要とされる。食品加工業者や品質管理部門では、検査結果の即時性により製品の出荷遅延やリコールのリスクを低減できるため、操作が簡便で専門的な訓練を必要としない機器が求められる。また大量のサンプルを効率的に処理できる高スループットなシステムも重要である。

最後に、環境モニタリング分野、特に水処理施設や環境保護団体、政府機関では、環境中の病原体の監視が不可欠である。現場での迅速な検査が可能なポータブルかつ堅牢なシステムや、遠隔地からでもデータにアクセス・管理できる機能が求められ、これによって公衆衛生上のリスクを早期に発見し、適切な対策を講じることが可能となる。

これらの多様な顧客ニーズと要求事項を踏まえると、細菌検査における菌種および抗菌薬感受性の同定を迅速化するデバイスの開発において、戦略をもって注力するポイントとして次の4つが考えられる。第1に、異なる顧客セグメントのニーズに柔軟に対応できる拡張性と適応性の高いシステムを開発すること。第2に、ハードとソフトをうまく統合することでデータ解析の高度化と自動化を実現し、診断精度の向上と労力の削減を図ること。第3に、ユーザーインターフェースの最適化により直感的で使いやすい設計を追求し、幅広い利用者層への対応を可能とすること。第4に、コネクティビティの強化により既存の医療情報システムやクラウドベースのデータ管理プラットフォームとの連携を促進することである。

これらの顧客ニーズを適切に読み解き、新しい技術やアプローチを導入することで、参入した市場において競争優位性を確立することができる。また、5.1.2.で述べたように、新興国市場や特定の感染症リスクが高い地域に対して迅速検査装置の需要が拡大している点も参入の機会として捉えられる。一方で、この市場への参入にはいくつかのリスクも伴う。5.1.3.で示したとおり、競合大企業の既存製品が市場にしっかりと根付いており、新規参入者がシェアを奪うには技術的・コスト的な優位性を明確に打ち出す必要があること。また、医療機器の市場参入には各国で異なる規制や認証手続きが求められるため、承認取得までの時間とコストが大きな障壁になることである(5.4.参照)。これらは投入した資本の回収までのタイムスケールが他の分野よりも長期間に及ぶことを意味しており、資本金のない中小企業にとっては高い参入障壁となる。

5.2. 競合製品の現状と新アプローチによる優位性の検討

本節では、細菌の迅速な同定および抗菌薬感受性試験を目的とする既存の競合製品について、その概要、利点、課題、そして臨床現場における評価を総合的に検討する。多様な技術を基盤とした製品が存在し、それぞれが独自の強みを持つ一方で課題も残されている。これらの現状を踏まえ、臨床現場で求められる要望に対し、本研究で提案する新しいアプローチがどのように貢献し、競争優位性を持ち得るかを検討する。

5.2.1. 市場における競合製品の概要、および臨床現場における評価

市場には、現場からのニーズを満たすような細菌の迅速な同定と抗菌薬感受性試験に関する多様なデバイスが存在し、従来の培養法以外にも、質量分析法、分子診断技術、フローサイトメトリーなど、さまざまな技術を基盤としている。これらの製品は、それぞれ独自の利点を有する一方で、迅速性、コスト、適用範囲、抗菌薬感受性試験への対応などにおいて課題を抱えている。2.1.1.で述べた学術的な側面からの視点とは別に、ここでは現場での実際の使用やコストなどの点からそれぞれの特徴をみていく。

まず、従来の培養法ベースの検査システムは、細菌を培地で培養し、形態学的特徴や生化学的性状を観察する長年にわたり確立された手法である。その信頼性と広範な細菌種への対応能力は高く評価され、依然として標準法として重視されている。しかし、結果が出るまでに24～72時間を要し、労働集約的で手技に習熟した検査技師が必要である点が課題である²²。

質量分析技術を用いたMALDI-TOF MSは、細菌や真菌を構成するプロテオームプロファイルを取得し、菌種を迅速に同定する手法である。数分以内に結果が得られ、高い精度で多くの細菌種を同定可能であり、装置導入後のランニングコストが比較的低い点が利点である²³。菌種同定の迅速性と正確性が高く評価され、日本でも保険収載された後は大病院を中心に導入が進んでいる。しかし、抗菌薬感受性試験には非対応で別途試験が必要であり、一部の菌種ではサンプル前処理が煩雑であることや、高額な初期投資が必要であることが課題となっている。

分子診断法ベースの迅速検査キットとして、PCRなどの分子生物学的手法を用いて特定の遺伝子を検出する方法もある。これらは高感度・高特異性で、結果が数時間以内に得られるという利点があり、救急や集中治療室での利用価値が高い²⁴。しかし、検出可能な菌種が限定的であり、臨床現場で利用するにはあらかじめ同定したい菌種を選定しておく必要がある。また、生菌と死菌の区別が困難であること、高コストであること、抗菌薬感受性試験には非対応であることなどが課題として挙げられる。これらの制約により、日常的な使用には予算的な制約が生じる場合が多い²⁵。

また、本研究と同様に、光を用いた技術を基盤とするフローサイトメトリーをベースにした迅速検査手法も存在する。細菌細胞の光散乱特性や蛍光標識を利用して解析する方法で、2～4時間で結果が得られ、抗菌薬感受性も同時に評価可能である²⁶。しかしPCRと同様に、やはり特定の菌種や抗菌薬に限定され、操作に専門知識が必要であり、汎用性と操作性に課題が残る。

臨床現場では、これらの先行製品に対して性能、コスト、使いやすさなど多角的な視点から状況に応じて、各製品の利点を活かしつつ、対象疾患と患者の状況、コスト、アクセス性などを考慮し、場合によっては複数の装置による検査結果を照合し、最終的に医療従事者が総合的に判断することが多い。

筆者自身が、臨床現場で検査方法を総合的に考える立場であることから、実用的かつ（可能であれば）望ましい条件としては次の点が挙げられる。まず、迅速な結果提供が求められており、理想的には1～2時間以内に検査結果を得たい。また、広範囲の菌種と抗菌薬に対応できる汎用性を持つことが重要である。さらに、高い精度と再現性があり、検査結果の信頼性が保証されていることが求められる。加えて、使いやすさと自動化による労力の軽減が期待され、専門的な訓練を必要としない操作性が望ましい。最後に、導入コストおよびランニングコストの低減が必要であり、コスト効率の向上が重要である。

以上の点を踏まえ、新たなデバイスの開発においては、迅速性、汎用性、精度、使いやすさ、コスト効率の5つの要素をバランス良く向上させることが重要であると考ええる。

5.2.2. 新しいアプローチによる競争優位性

本論文の2章から4章で述べた自家蛍光と分光計測技術を用いた新しいアプローチは、既存製品が抱える課題を解決し、細菌検査における菌種および抗菌薬感受性の同定を迅速化するデバイスとして、既存の競合製品に対するいくつかの優位性をもたらす可能性がある。

まず、迅速性と統合的検査の面では、光学的手法により数分から数十分程度で菌種を同定することが可能である。抗菌薬感受性の評価については、薬剤に対する細菌の挙動を観察するために数時間程度の培養が必要となる可能性があるが、従来の方法と比較して結果提供までの時間を大幅に短縮できる。これにより、迅速な診断と治療方針の決定に貢献し、適切な抗菌薬治療を早期に開始することが可能となる。

次に、高精度かつ非破壊的な検査が可能である点が挙げられる。分光計測技術は非破壊的測定を可能とし、サンプルを破壊せずに直接測定できるため、ライブセルの状態で細菌の挙動をリアルタイムで観察でき、同定過程においてより正確な診断につながる可能性がある。

さらに、自家蛍光の利用による試薬が不要であることも大きな利点である。自家蛍光を活用することで、標識試薬や専用の薬剤、ディスポーザブルなプレートが不要となり、試薬や消耗品のコスト削減と検査プロセスの簡素化が実現する。これにより、経済的なメリットが期待できる。多様なサンプルタイプへの適応性に関しては、現時点では血液や尿などの多様な検体に対応できるかは明確ではない。しかし、機械学習アルゴリズムの最適化と十分な教師データの準備により、背景ノイズを除去し、多様なサンプルタイプに対応できる可能性がある。これにより、広範な診断領域への適用が期待され、さまざまな感染症に対する臨床現場での利用価値を高めることができる。

また、データ蓄積による診断精度の向上も重要な強みである。機械学習の活用によって、蓄積された分光データと他検査での同定結果を解析し、診断精度を継続的に向上させることが可能である。データが蓄積されるほどアルゴリズムの精度が向上し、より正確な診断が期待できる。

以上のように、分光計測技術を用いた新しいアプローチは、迅速性、精度、非破壊性、コスト効率、新たな情報取得の可能性など、多くの利点を兼ね備えた革新的なソリューションとなり得る。これらの利点は、臨床現場での迅速な診断と適切な治療選択に大きく貢献し、最終的に感染症治療の質を向上させる可能性が高い。しかし、その実現には技術的課題の克服と適切な導入戦略が不可欠であり、競合製品との差別化を図りつつ、臨床ニーズに応える製品開発を進めていく必要がある。

5.3. ビジネスプランの戦略的構築と実行計画

検査デバイスの市場投入を成功させるためには、明確で実現可能なビジネスプランの策定が不可欠である。これまでの市場分析で明らかになった需要や競合状況を踏まえ、具体的なビジネスモデルの構築、収益予測、そして開発・販売スケジュールを策定する必要がある。本節では、デバイスのビジネスモデルを詳細に検討し、収益性と市場性を評価する。また、製品化から市場投入までのスケジュールを設定し、持続可能な事業運営の基盤を構築するための戦略を示す。

5.3.1. ビジネスモデルの構築

本論文において研究開発を論じているデバイスは、細菌の自家蛍光を分光計測しそのデータを機械学習で解析することによって、細菌に関する情報を迅速に同定するという点を特徴として持つ。5.1.による市場全体の把握と、5.2.で競合製品を分析しつつ現場で求められるプロダクトの要件を検討してきたが、これらを踏まえた上で実際にプロダクトを市場展開すると想定し、より具体的に製品の概要、ターゲットユーザー、市場の課題とニーズ、競合状況、技術的・法的な参入障壁、ビジネスモデルの形態、そしてコスト構造について、前節までの内容を一部まとめつつ総合的に記述する。

まず、製品の概要とターゲットユーザーとして、本デバイスは従来の培養法よりも短時間で結果を得ることが可能であり、感染症の迅速な診断が求められる医療機関、特に救急部門や集中治療室、診療所、臨床検査機関、そして感染症専門医を主な対象としている。5.1.で述べたように市場の課題とニーズを考慮すると、現在の細菌検査では結果を得るまでに数日を要し、迅速な診断と適切な治療の開始が困難であるという問題がある。また、高コストや操作の専門性が高いことも課題として挙げられる。本デバイスはこれらの課題を解決し、迅速な細菌同定と抗菌薬感受性の判定、感染症の早期診断と適切な治療の開始、抗菌薬の適正使用の促進、医療コストの削減、そして患者の予後改善に寄与することを目指している。5.2.で述べたように競合他社の状況を鑑みると、市場にはPCRや質量分析を用いた迅速検査デバイスが存在するものの、高コストで操作が複雑である点が問題となっている。本研究のデバイスはこれらの欠点を解消し、低コストかつ高精度な検査を提供できる点で、競合優位性を有すると考えている。

ビジネスモデルの形態としては、製品販売だけでなく、メンテナンス契約やクラウド経由での解析・データベースのアップデートサービスを提供することで、継続的な収益を確保することを考えている。また、リースモデルの導入により、小規模の医療機関にも対応できる柔軟なビジネスモデルを想定している。製品やサービスを顧客に届けるためのチャネルとして、医療機器販売代理店や大規模病院への直接販売、学会や展示会でのデモンストレーション、論文発表を活用する予定である。

コスト構造として、研究開発費、製造コスト、人件費、マーケティング・販売費用、知的財産関連費用、クラウドサーバー関連のインフラコスト、規制対応コスト、アフターサービスコスト、資金調達コストなどが考えられる。特に、研究開発費が重要であり、高性能で信頼性の高いデバイスを提供し続けるためには、継続的な投資が必要である。また製造コストの最適化は、内部留保のない中小零細企業が競争力のある価格設定と利益確保を行っていくためには欠かせないと思う。

5.3.2. 収益予測

収益予測を立てるにあたり、初期投資とコスト分析、売上予測、損益分岐点の計算、そしてキャッシュフローの見通しについて検討した（迅速検査デバイスの市場投入後に収益性を確保するためには、ある程度正確な予測が必要であるが、プロダクトがまだ途上段階にあることや、具体的な数字が不透明であるため、本節では詳細な数字の記述は省略する）。

初期投資には、研究開発費、臨床試験費用、認証取得コスト、製造設備の整備費用、マーケティング・販売準備費用、規制対応費用、そして運転資金が含まれる。これらの費用について現時点で詳細に論じることは困難であるが、およそ数千万円から億単位のオーダーである可能性が高く、特に本研究で扱った医療機器の場合、ISO 13485の取得や薬機法の認証取得、製造設備への投資に関わるコストが高額となる可能性がある。これらについては既存の医療機器製造メーカーと協業をして対応が可能と考えられる。

(5.3.4.参照)。また初期の臨床試験や薬事法の承認取得の段階では、日本医療研究開発機構（AMED）などの公的助成支援を効率的に活用することで、資金面での負担を軽減することを検討している。売上予測に関しては、デバイスの価格を数百万円と想定しているが、ビジネス初期から医療機器承認を取得するのは困難であると考えられるため、初期には医療以外の研究実験用途や食品分野での販売による資本回収をメインとする方針である。そのため、初年度の販売台数は約数十台程度と見込んでいる。5年以内に累計で1000台の販売を目標とし、徐々に医療機関への導入を進めていく計画である。

損益分岐点は、人件費、研究開発費、マーケティング費用などの固定費と、製造コストに代表される変動費から算出されるが、本論文では具体的な数字については割愛する。

将来的な売上高の予測においては、国内の医療機関における迅速な細菌検査の需要を評価することが重要である。大病院および中小病院の入院・外来患者数、感染症患者数、さらにそのうち細菌検査を必要とする割合や、迅速な診断が求められる緊急ケースの割合を勘案することで、一定の見積もりが可能である。主要医療機関における迅速検査のニーズに基づき、必要とされる装置数と売上目標の設定ができる。

一方、装置の価格設定については、保険診療報酬点数が大きな影響を及ぼす点に留意しなければならない。診療報酬点数は2年ごとに改定され、その変更が価格戦略に影響するため、正確な長期予測は困難であるため、これらの政策の変動に対応できる柔軟な価格戦略を構築する必要がある。なお、2024年末現在の細菌培養および同定検査の診療報酬点数は検体の部位ごとに以下の通りである²⁷。

- 口腔、気道、呼吸器からの検体：180点
- 消化管からの検体：200点
- 血液または穿刺液：225点
- 泌尿器または生殖器からの検体：190点
- その他の部位からの検体：180点
- 簡易培養：60点

また、抗菌薬感受性検査（D019）の点数は、1菌種：185点、2菌種：240点、3菌種以上：310点であり、加えて薬剤耐性菌検出には50点、抗菌薬併用効果スクリーニングには150点が付与されている²⁸。これらの報酬点数の影響を考慮しつつ、迅速検査装置の導入を促進するために、合理的な価格設定と売上予測を立てる必要がある。

キャッシュフロー全体では、臨床試験費用と規制対応コストなどの初期投資が大きいため、初期段階ではキャッシュアウトフローが非常に大きくなることが予想される。医療機器としての承認取得までの期間における資本の減少に対して、研究用や食品分野での売上によるキャッシュインフローで少しでも補いながら、資金繰りを安定させることで、研究開発や臨床試験の継続的な実施が可能となり、長期的な成長につなげていくことができる。

以上の分析から、このビジネスは初期の資金需要が大きく、収益化までに時間を要するものの、市場ニーズを的確に捉えた戦略を持って柔軟な経営を行うことで、持続的な成長が期待できると考えられる。ただし、市場の変化や競合状況、診療報酬制度の改定など外部要因によって予測が大きく変動する可能性がある点に注意する必要がある、継続的な市場調査と戦略の見直しが不可欠である。

5.3.3. マイルストーンの設定

これまでの研究開発を継続し、望ましい概念実証（Proof of Concept）が得られると仮定した場合の製品開発から市場投入までのスケジュールを策定し、市場への投入までのスケジュールについて検討した。開発プロセスを効率的に進めるためには、段階的な目標を明確にすると同時に、法規制などの外部環境に左右されやすいことを考慮し、柔軟なスケジュール調整が可能な体制を整える必要がある。これらを踏まえ表5-1のように複数のマイルストーンを設定した。

まず、プロトタイプの完成と性能評価の達成を目指し、製造プロセスの確立と初期生産ラインを構築する。その後、規制当局との事前相談を実施して臨床試験プロトコルを策定し、臨床試験を開始する。臨床試験の完了とデータ解析を経て、中間データの分析を並行しながら医療機器承認申請の準備を進め、最終

的に医療機器承認の取得を目指す。また、臨床試験と並行して初期市場への製品投入による国内販売を開始し、医療機器としての正式な国内販売に移行する。その後、累計販売台数の目標達成を図り、海外市場への展開を開始する計画である。一方で、この計画には技術的な課題や規制認証の遅延、競合他社の参入、市場の受容性が予想を下回る可能性など、いくつかの主要なリスクが存在する。また、開発コストの増大や資金調達の難航の他、一般的な製造系の事業と同じように重要人材の離職、サプライチェーンの問題についても対応する必要がある。

したがってこれらに対して、リスク管理戦略を策定しなければならない。技術的リスクには、2章から4章で記述した自家蛍光の分光計測を用いた手法と並行して複数のアプローチを研究し、バックアッププランを用意する。規制リスクには、規制当局との早期かつ頻繁なコミュニケーションを行い、また薬事に関する専門コンサルタントを活用する（5.4.参照）。市場リスクに対しては、継続的な市場調査と製品価値提案の調整を行い、初期採用者との緊密な連携を図る。財務リスクには、複数の資金調達オプションを確保しておく（5.5.参照）。運営リスクには、重要人材の育成と知識の分散を図り、複数のサプライヤーを確保することで対応する。スケジュール調整の柔軟性を確保するため、各フェーズを並行して進めつつ、余裕期間を設定しておく必要がある。定期的にスケジュールを見直し調整するとともに、予期せぬ問題が発生した場合の対応を再検討し、全体的な目標達成を目指す。

表5-1 最終的な目標に達するまでのマイルストーン

文頭の数字は概念的な時間軸の前後関係。

1	プロトタイプの完成と性能評価達成
2	製造プロセスの確立と初期生産ラインの構築
3	規制当局との事前相談を行って臨床試験プロトコルを策定
4	臨床試験の開始
5	臨床試験の完了とデータ解析
6	（中間データの分析を並行しながら）医療機器承認申請の準備
7	医療機器承認の取得
8	（臨床試験と並行しながら）初期市場への製品投入による国内販売開始
9	医療機器としての国内販売開始
10	累計販売台数の目標達成
11	海外市場への展開開始

5.3.4 パートナリシップの構築と成功指標の設定

製品開発、規制への対応および市場投入の成功には、適切なパートナーとの提携が不可欠である。製造および販売における協業企業の選定と提携戦略を進め、その成果を最大化するための成功指標を設定し、定期的に評価することが重要である。

まず、製造パートナーとしては、医療機器製造業ライセンスを持ち、将来的な海外展開を見据えてISO 13485に準拠した品質管理体制を有する企業との協力が必要不可欠である（5.4.参照）。療機器としての要件だけでなく、精密機器の製造経験や光学系・電子機器などのハードウェアの製造ノウハウを持つことが求められる。さらに、継続的なアップデートを行い、解析や現場での実使用データの収集を可能にするソフトウェア開発のノウハウも有している必要がある。これらの需要に応じた柔軟な生産体制を構築できる企業が望ましい。

次に、販売パートナーとしては、医療機器製造販売業ライセンスを持ち、国内外に強力な販売網を有する企業を選定する必要がある。医療機器市場、特に体外診断用医療機器の販売経験がある、あるいは類似した装置に精通し、主要な医療機関との強固な関係を築いている企業との提携により、迅速な市場浸透を

図ることが可能となる。これらのパートナーシップの構築にあたっては、業界展示会や学会での接点作りや既存のネットワークの活用を通じて候補企業との協力関係を築く。また、共同開発やマーケティング活動を通じて、長期的な協力関係を構築することを目指したい。

ビジネスプランの実施においては、成功指標（Key Performance Indicator：KPI）を設定し、それに基づいて定期的な評価とフィードバックを行うことが一般的である。本ビジネスモデルの場合、財務的な指標として固定費・変動費に対する売上高、利益率、投資回収期間をモニタリングすることで財務健全性を確保できると考える。また、製品性能に関しては主に検査精度、それ以外にも検査時間と他の検査手法との差異を評価し、継続的な改良を促進する。運営効率については製造リードタイム、在庫回転率、従業員の生産性などを管理し、業務効率の向上を図る。そして、市場浸透度を評価するために、販売台数、市場シェア、顧客満足度を測定し、製品やサービスが市場でどの程度受け入れられているかを把握することができる。これらの指標を基に、事業の進捗を定期的に評価し、戦略や計画を見直す。特に、臨床現場におけるユーザーからのフィードバックを重視し、製品やサービスの改善に反映させることで、顧客満足度の向上が見込めるとともに、資本力で優位な他企業に対して市場での競争力強化を目指す。

5.4. 医療機器市場参入のための法的要件とリスク管理

医療機器の開発と市場投入において、関連法規制の遵守と適切な承認・認証の取得は不可欠である。本節では、国内外の医療機器に関する法規制の概要を整理し、承認プロセスと認証取得の手順を示す。また、新規参入者が直面する規制面での課題やリスクについて考察し、これらを克服するための戦略を検討する。

5.4.1. 医療機器に関する各国の法規制の概要

医療機器はその製造および販売にあたって、患者の生命や健康に直接影響を及ぼす可能性がある点を考慮し厳格な法規制の対象となっている。その規制の目的は、安全性と有効性を確保すること、ならびに公衆衛生を保護することである²⁹。特に体外診断用医療機器は診断結果が治療方針に影響を与える事が多いため、各国・地域で様々な規制が設けられている。国際的な市場展開を目指す場合に各国の違いを理解しておく事が必要である。

日本では、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（薬機法）に基づき、医療機器が規制されている（表5-2）。医療機器はリスクに応じてクラスIからクラスIVまでの4つのクラスに分類され、クラスIIの場合、第三者認証機関による審査が必要となる。米国では、医療機器は連邦食品医薬品化粧品法（FD&C Act）の下で規制され、食品医薬品局（FDA）が監督機関として機能している。体外診断用医療機器はクラスIからクラスIIIに分類され、クラスIIの場合、510（k）と呼ばれる申請が必要となる。これは、製品が既存の合法的に販売されているデバイスと「実質的に同等」であることを示すプロセスである。欧州連合（EU）では、2017年に医療機器規則（MDR）と体外診断用医療機器規則（IVDR）が発効し、より厳格な規制体系が導入された。IVDRではリスクに基づく新たな分類システムが採用され、クラスBに該当するデバイスは、認定機関（Notified Body）による審査とCEマークの取得が必要である。CEマークは、製品がEUの安全性、健康、環境保護の基準を満たしていることを示す。

表5-2 薬機法に基づいた日本の医療機器のクラス分類

それぞれのクラスにおける取り扱うリスクレベル、対象となる医療機器とその例、および必要とされる審査手続き。

リスクレベル		対象	例	審査・認証手続き
クラスI	低リスク	一般医療機器	ガーゼ、包帯、医療用手袋	届出のみ（承認・認証は不要）
クラスII	中リスク	管理医療機器	電気メス、超音波診断装置、血圧計	第三者認証機関による認証が必要
クラスIII	高リスク	高度管理医療機器	人工骨、コンタクトレンズ、心電計	PMDAによる承認が必要
クラスIV	最も高いリスク	高度管理医療機器	ペースメーカー、人工心臓弁、人工血管	PMDAによる厳格な承認が必要

これら主要市場における医療機器規制は、基本的な枠組みは類似しているものの、詳細な要求事項や手続きには差異が存在する（表5-3）。例えば、日本特有の事項として、外国製造業者が日本で医療機器を販売する場合「総括製造販売責任者」を置くことが義務付けられており、日本国内に拠点を持つ必要がある。また日本の品質管理システム（QMS）はISO 13485と類似しているが、独自の基準や手順も含まれている。さらに、医療機器の広告や販促活動に対する規制が厳しく、事前に承認を得る必要がある点も特徴的である。

米国特有の事項として、FDAは「デノボ（De Novo）」分類を提供しており、新規でリスクが中程度のデバイスに対する柔軟な承認プロセスが存在する。また、サイバーセキュリティに関する規制が強化され

ており、ネットワーク接続機能を持つ医療機器には詳細なセキュリティ対策が求められている。さらに、FDAは「ブレイクスルーデバイスプログラム」を実施しており、画期的な医療機器の開発・審査を迅速化する取り組みが進められている。最後に欧州特有の事項として、MDRおよびIVDRにより「規制遵守責任者（PRRC）」の配置が義務化され、製造業者は専門的な知識を持つ人材を確保する必要がある。また、臨床評価や市販後監視（PMS）の強化が求められ、製品の安全性データを継続的に収集・報告する体制が必要となっている。さらに、Unique Device Identification（UDI）の導入により、医療機器のトレーサビリティが向上し、偽造品対策やリコール時の対応が迅速化されている。

デバイスの開発と市場投入に際しては、各国・地域の体外診断用医療機器に関する特別な規制要件に対して、専門家と協力しながら注意を払って対応していく必要がある。医療機器メーカーとしてグローバル展開を目指す場合には各国・地域の規制要件を十分に理解し、適切に対応することが求められる。

表5-3 日米欧規制当局の医療機器に関連する規制の特徴

各国の既成の枠組みとその特徴

	日本	米国	EU
規制の枠組み	薬機法	FD&C Act	MDRおよびIVDR
分類システム	クラスI～クラスIV	クラスI～クラスIII	リスクに基づく新たな分類（クラスA～D）
デバイスの審査（クラスII相当）	第三者認証機関による審査	510（k）申請	Notified Bodyによる審査 CEマーク取得
審査期間	約3～6ヶ月	法定90日（実際は6ヶ月～1年）	約6ヶ月～1年以上
審査費用	数十万～数百万円	約19,870ドル（2023年度）	数万～数十万ユーロ
年間承認件数	数千件	数千件	規制の影響で変動
特記事項	- 総括製造販売責任者の配置 - 日本独自のQMS要件 - 広告販促活動の厳しい規制		
品質管理システム	- ISO 13485への準拠 - 日本独自のQMS要件 - De Novo分類による柔軟な承認プロセス - サイバーセキュリティ規制の強化 - Breakthrough Device Programの実施 - FDAのQSR （ISO 13485との調和進行中） - PRRCの配置義務 - 臨床評価と市販後監視の強化 - UDIの導入によるtracability向上 - ISO 13485への準拠 - MDR/IVDRの強化要件		

5.4.2. 本邦における医療機器承認プロセスと認証プロセス

医療機器を市場に投入する前には、その安全性と有効性を確認するために、規制当局が定める承認プロセスと認証を経る必要がある。「承認」とは、規制当局が個別の医療機器について安全性・有効性を審査し、販売を許可することであり、一方の「認証」は、第三者機関が製品や品質管理システムが規格に適合していることを確認するものである。日本の規制では、一部のクラスII機器については、第三者認証機関による認証のみで市場投入が可能であるが、クラスIIIおよびクラスIVといった高リスク機器ではPMDAの承認が必要である。認証には明示的な基準が作成されているが、承認の場合には企業は自身で必要と考えられる検査や点検項目について設定した上で、PMDAによる承認プロセスを経る必要がある。

まず、デバイスがどのリスククラスに該当するかを各国の規制に基づいて決定する必要がある。本研究で開発している迅速検査デバイスは、体外診断用医療機器で直接人体への影響があるわけではないが、菌種同定と抗菌薬感受性の測定を目的としており、その測定結果が臨床上治療方針などに影響を与える可能性があるため、リスク特性からクラスIIに相当する可能性が高い。クラスIIの体外診断用医療機器では、感度、特異度、正確性、精密性などの分析性能試験が必要であり、また干渉物質の影響評価や安定性試験を行い、デバイスが臨床的に信頼できる結果を提供できることを実証する必要がある。それと同時に、臨床検体を用いた性能評価や既存の標準的手法とを比較した臨床性能試験結果の提出も求められる。これら

の試験結果をデバイスの有効性と安全性を裏付けるデータとして揃える必要がある。これらの性能に関する試験と同時に、製品製造に関する規制項目もクリアしなければならない。ISO 13485に準拠した品質管理システム（QMS）を導入し、設計、製造、出荷、アフターサービスまでの全プロセスで品質を保証する必要がある。製品の仕様、試験データ、リスク評価、臨床評価の結果などを含む技術文書を作成し、認証機関による審査の基礎として申請書類を準備する（5.4.4.参照）。

さらに、製品の種類やクラスによっては、電気的安全性試験や電磁両立性（EMC）試験、生物学的安全性試験を実施し、製品が安全基準を満たしていることを確認する必要がある。また、ソフトウェアを伴う場合にはその検証・妥当性確認を含め、ソフトウェアライフサイクルプロセスの文書化やリスク管理への対応策も求められる。

これらの評価とデータ収集を単独の企業が全て自己完結するには、多くの専門的な人員と設備、そして莫大な費用がかかる。したがって、一般的には外部の試験機関への委託や医療機関との共同研究などによってデータを収集し、収集したプロダクトデータや臨床データの分析と評価を行い、臨床評価報告書を作成する。これらの書類の準備にあたっては、提出前の段階から規制当局と綿密に相談することも重要である。日本ではPMDAの対面助言という形で申請前の事前相談窓口が設けられている（欧州では認証機関との事前協議、米国ではFDAとのプレサブミッションミーティング）。

規制当局からの照会事項への回答や追加データの提出を行い、当局からの要求を全て満たした後に審査を経て、最終的に承認を取得できる。ただし、これで規制当局との関係が終わるわけではない。承認後は、市販後調査の計画と実施、不具合報告システムの構築などが義務付けられている。さらに、品質マネジメントシステムの維持、技術文書の更新、臨床評価報告書の定期的な見直しなど、認証取得後にも多くの作業が必要である。承認プロセスは時間とコストがかかるため、専門家の助言を受けながら開発初期から計画的に、効率的なプロセスを構築することが重要である。

5.4.3. 新規参入の課題とリスク管理

ここまで述べてきたように、医療機器市場への新規参入を目指す企業は実に多岐にわたる法規制の遵守と品質管理の確立という複雑な課題に直面する。特に資本力の乏しいスタートアップ企業にとって、これらの許認可に対する要件が参入を躊躇させる大きなハードルとなっている³⁰⁻³¹。本邦では医療機器の製造および販売に関連する許認可として、医療機器製造業許可、医療機器販売業許可、医療機器製造販売業許可の3つの資格が存在する。これらの資格は、医療機器の安全性と品質を確保するために相互に補完的な役割を果たす。製造を行う事業者には医療機器製造業許可が、製造物の市場への出荷を行う事業者には医療機器製造販売業許可が、販売および貸与を行う事業者には医療機器販売業許可が必要となる。以下、それぞれの認可における必要とされる条件について記述する。

医療機器製造業許可を取得するためには、まずGood Manufacturing Practice（GMP）を遵守するための環境構築が必要となる。これは医療機器の製造における品質管理基準であり、製造プロセスの一貫性と製品の品質を確保するために、製造設備の整備や製造手順書の作成、定期的な内部監査の実施が求められる。また、必要に応じてISO 13485の製造プロセス（5.4.4.参照）に関連する部分の適用も求められる場合がある。さらに、人員の要件として、製造工程全体を管理する製造管理者と、品質を管理する品質管理責任者を配置する必要がある。法定点検年度にはこれらに対する対応を基準通りに行っているかの外部監査が行われる。

医療機器製造販売業許可を取得するためには、ISO 13485に準拠した品質管理システム（QMS）の導入が必要である。これは、医療機器の設計、開発、製造、販売、サービスにおける品質管理の要求事項を満たすためである。さらに、ISO 14971に基づくリスク管理の実施も求められ、製品のライフサイクル全体にわたってリスクを管理することで、安全性と信頼性を確保する。また、製造物責任法（PL法）や医薬品医療機器等法（薬機法）への対応として、製品に起因する損害に対して法的責任を負う義務がある。そのため、製品の安全性を確保し、適切な表示や説明書を作成することが求められる。人員の要件として、製造販売業務全体を統括する総括製造販売責任者を配置する必要がある。この責任者は、品質管理や安全管

理、製品の出荷可否の判断など、製造販売業務の最終的な責任を負う。また、品質保証責任者と安全管理責任者という専門分野ごとの責任者を配置し、それぞれの分野での法令遵守と品質・安全性の確保に努める必要がある。

医療機器販売業許可に関しては特定の国際規格への準拠は必須ではないが、人員の要件として販売業務管理者を配置する必要がある。この管理者は、医療機器の販売や貸与に関する業務が法令に適合して行われるよう責任を負う。

5.4.4. 国際規格と標準への適合

国際規格への適合は、開発した迅速検査装置の品質と安全性を国際的に保証し、国内市場からグローバル市場への参入を円滑に進める上で不可欠である。本装置に関連する主要な国際規格と、その適合に向けた具体的な取り組みについて述べる。

ISO 13485は医療機器の品質マネジメントシステムに関する国際規格であり、設計・開発から製造、販売、サービスに至るまでの要求事項を定めている³²。多くの医療機器製造業企業にとってグローバル市場での競争力を維持し、各国の規制要件を満たすためにはこのISOの認証取得が必須と言える。本装置の品質管理システム構築においてもこの規格を基盤として活用することが求められる。

ISO 14971は医療機器のリスクマネジメントに関する国際規格であり、リスクの分析、評価、コントロールのプロセスを詳細に規定している。装置の安全性を確保し、継続的な改善を図るために必要とされる³³。また電気医療機器の安全性に関する国際規格としてはIEC 60601もあり、電氣的安全性を確保するための具体的な要求事項を提示している³⁴。設計・製造において、これらの規格に適合することで、電氣的な安全性を保証し、ユーザーや患者へのリスクを最小限に抑えることができる。

ソフトウェアに関する規格としてIEC 62304が挙げられる。これは医療機器ソフトウェアのライフサイクルプロセスを規定し、開発から保守に至るまでの要求事項を明確にしている³⁵。本装置の菌種同定や抗菌薬感受性分析に用いるアルゴリズムの開発とバリデーションにおいてこの規格の適用が望ましい。

また、臨床検査や微生物検査に関する詳細な手法と基準としてCLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) のガイドラインも有効であり、国外の規制当局による承認本装置における菌種同定や抗菌薬感受性試験の方法論の開発や性能評価においてこのCLSIの指針を参考にすることが有益である。

これらの国際規格への適合を進めるにあたり、具体的な方策を講じる必要がある。まず、社内に国際規格に精通した専門家を育成し、規格要求事項を設計開発プロセスに組み込むことが重要である。なぜならばこれら国際規格は取得後も継続的な運用が求められ、また定期的な法定点検時に実際にこれらを運用しているという実績を証拠として提出することが求められるからである。また外部の専門コンサルタントを活用し、適合性評価試験の計画と実施を効率的に進めることも効果的である。さらに、技術文書やエビデンスの整備、製造工程での規格遵守の徹底、市販後のモニタリングと是正措置の実施など、総合的な取り組みが求められる。一方で5.4.1.や5.4.2.で述べたような各国のローカル規制は、基本的にはこれらの国際規格を基盤としているものの、細部において差異が存在する。そのため国際展開を考える場合には各国の具体的な要件を詳細に理解し、国際規格とローカル規制の双方に適合するような製品開発が設計やビジネスモデル構築の段階から不可欠であるといえる。しかし同時に、細かい差異を念頭に置いた上でのこれらの国際規格に準拠した品質管理とリスクマネジメントシステムを導入することは、複数の国での認証取得プロセスを効率化し、また効率的に市場参入する戦略を構築する際の目安ともなると考えられる。

本装置は、自家蛍光分光計測技術や機械学習アルゴリズムといった比較的新規性の高い要素を含んでいるため、国際規格への適合には新たな課題が生じる可能性があるが、これらの課題を克服し、国際的に信頼される高品質な製品の開発・提供を目指していきたい。

5.5. 研究開発費の確保と持続的資金戦略

本節では、研究開発費の必要性和目的、資金調達戦略、資金調達のステップ、助成金・補助金と他人資本の違い、長期的な資金確保戦略について論じる。

5.5.1. 研究開発費の必要性和目的

本研究開発は、4.4.で述べたようにまだ完了しておらず、引き続きデバイスの改良を目的として試作と解析を繰り返す必要がある。十分な研究開発費を確保して、基礎研究に引き続いて応用研究を完遂すること、試作したプロダクトを実使用に耐えうるレベルに洗練させること、そして市場投入前のプロダクトの性能試験を行い有効性を証明することは、プロジェクトの成功と将来的な商業化に向けて不可欠である。

技術開発には、光学設計、電子回路設計、装置の構造設計など多岐にわたる専門知識と技術が求められ、それに伴う費用も発生する。デバイスに使用する光学部品や電子素子、検出器などは先進的な技術要素を含み、試作機の製造と性能評価には設備や計測装置の調達・維持にも資金が必要である。また、自家蛍光計測手法の最適化やデータ解析手法の改良(3.5.)、新たなモダリティとしての細菌種や抗菌薬感受性の検出方法の開発(5.3.5.)など、継続的な研究活動も重要であり、これらを推進するための研究開発費の確保は欠かせない。

さらに、医療現場での実用性を評価するための臨床試験の実施には莫大な費用が必要である。倫理委員会の承認取得、被験者の募集と管理、データの収集と解析、結果の評価と報告書の作成など、多岐にわたるプロセスに資金が求められる。医療機器として市場投入するためには、日本のPMDA、米国のFDA、欧州のCEマーキングなど各国の規制当局からの認証取得が必要であり、技術文書の作成、品質管理システムの構築、安全性試験や電磁適合性試験などのコストも発生する(5.4.)。

また研究開発費の獲得は、単なる資金の確保にとどまらず、外部からのプロジェクト評価や認知度の向上、潜在的な協力者、協業企業、支援者との関係構築の機会でもある。適切な研究開発費を獲得し、効果的に活用することで、革新的なデバイスの開発を加速させ、最終的に医療現場に貢献する製品の実現を目指す。

5.5.2. 資金調達の戦略

本プロジェクトを成功させるために、短期的な資金調達に留まらず、持続可能な長期的資金確保戦略を構築することが不可欠である。これまで、日本学術振興会の研究奨励金や地方自治体の医療機器関連助成金、民間財団からの助成金など、多様な資金団体から研究開発費の助成を受け、研究の継続と市場投入を視野に入れつつも学術的に多方面への様々な可能性を探るという多様性を維持してきた。これらの資金は基本的に返済不要であり、プロジェクトのリスク軽減に非常に有効であった。しかし、プロジェクトが進展し、試作機の完成や臨床試験の実施、さらには製品化に向けた取り組みが必要となる段階では、より大規模で戦略的な資金調達が求められる。今後の開発段階や市場投入を見据え、多様な資金源を組み合わせた資金調達計画を策定する必要がある(図5-2)。

資金調達の戦略として、研究開発の各フェーズ(基礎研究、プロトタイプ開発、臨床試験、製品化)に応じて適切な資金源を選定することが重要である。初期段階では、引き続き助成金や補助金を活用し、研究の自由度を維持しつつ基盤を固める。この期間では、試作機の開発と初期的な改良に焦点を当て、研究成果の整理と論文化、助成金申請書類の作成と提出、試作機の初期評価と改良計画の策定を行う。

次の段階では、試作機の性能向上と臨床試験の準備を進めるため、医療機関との連携が重要となる。また大規模な臨床試験に向けた資金調達も必要であり、政府の助成金に加えて、民間財団の研究助成金、産学連携プログラムも含めた多様な資金源を検討することができる。適切な助成金の選定と申請、協業企業の探索と交渉を進めていく。

さらに臨床試験拡大・認証取得段階では、デバイスの診断精度や再現性を確認するため、多数の患者サンプルを用いた大規模な臨床試験が必要となる。PMDA、FDA、CEなど各国の規制当局からの認証取得を目指すための資金も確保する必要があると考えられる。この段階では、政府系大型研究助成金(AMED、

NEDO等）、ベンチャーキャピタルからのシード投資、医療機器メーカーとの共同研究契約を通じて資金調達を行う。

製品化・市場投入段階では、臨床試験の成果に基づきデバイスの最終化と量産体制の確立、規制承認の取得、市場投入の準備を行うが、この段階ではベンチャーキャピタルからのシリーズA投資や戦略的支援企業からの出資、政府系の実用化支援助成金など、多様な資金源を活用することができる。事業計画書の作成や投資家向けプレゼンテーションの準備、製造・販売インフラの整備計画の策定、市場投入に向けたマーケティング戦略の実施、製品の認知度向上などを推進する。

これらの資金調達においては、そのステージに沿った資金提供者となるステークホルダーに対して、それぞれが求める適切なプロジェクトの強みを抽出し、効果的に伝えることが重要である（5.5.4.参照）。技術の革新性（自家蛍光を用いた迅速な細菌検査の独自性）、社会的インパクト（抗菌薬耐性問題への貢献）、市場性（医療現場での高い需要）、チームの専門性（光学と細菌学の融合による独自のアプローチ）を強調し、理解と共感を得ることができる。さらに、競争の激化や長期的な視点の必要性、技術の複雑さといった課題についても対処し、ステークホルダーと認識を共有する必要がある。

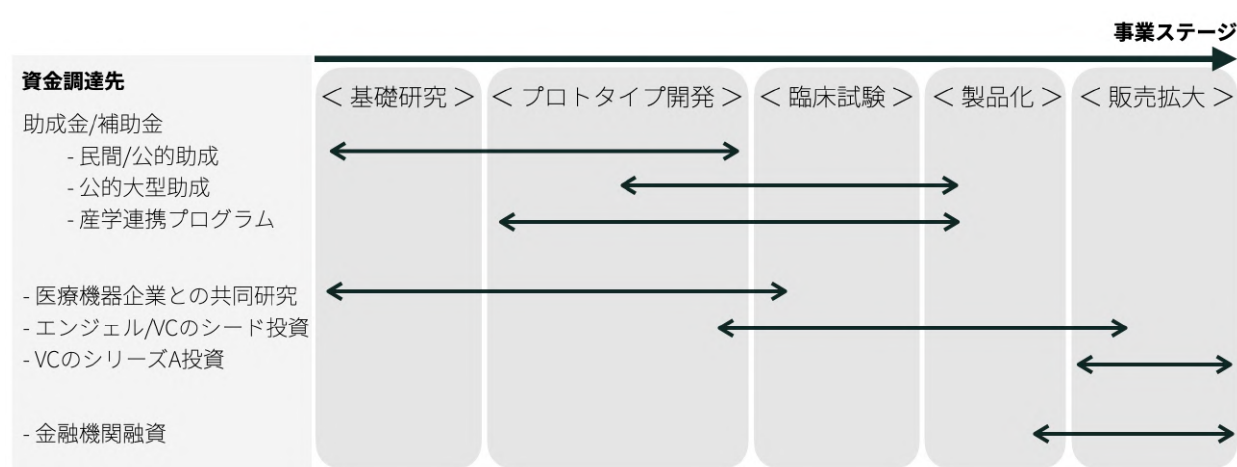


図5-2 事業ステージと資金調達先の選択肢（文献37から一部引用、筆者が改変）

縦軸は代表的な資金調達先、横軸は事業ステージ、↔は調達先が選択肢として考慮されるステージの時期を表す。

一方で、学術領域から発出したビジネスという強みを活かし、産学連携の強化を通じて、大学の研究資源と企業の開発・商業化能力を融合させ、安定的な資金源を確保することも可能である。医療機器メーカーや関連企業との共同研究により、技術のスケールアップや製造プロセスの確立、規制対応に関するノウハウを獲得しつつ、資金的な支援を得ることができる。大学発ベンチャーの設立を視野に入れ、研究成果の商業化を図ることで、大学からの支援を受けながら資金調達することも考えられる。また現場ニーズに立脚した課題解決型の中核アイデアを有することを考慮すると、クラウドファンディングの活用も有効な手段である。本デバイスは感染症診断の迅速化や正確な治療選択に寄与するため、昨今のグローバルゼーションに由来する感染症の急速な流行を踏まえて、医療現場のみならず一般市民からの関心も期待できる。プロジェクトの社会的意義を強調し、広く社会から資金を募ることで、資金調達と同時に製品の認知度向上も期待できるという利点もある。

前述の通り、医療機器業界は各国の規制当局による厳格な基準や要件に大きく依存している。このため、プロジェクトの各段階において、進捗状況の評価や資金使用状況の監視、新たな資金調達機会の探索を継続的に実施し、必要に応じて計画を修正・調整することが不可欠である。これらの規制対応のプロセスは、単なる資金管理の枠を超え、プロジェクト全体の柔軟性と適応力を高める重要な要素となる。特に、研究開発の進展や市場環境の変化に加えて、規制要件の改定や新たな基準の導入にも適切に対応することが求められる。例えば、日本のPMDA、米国のFDA、欧州のCEマーキングといった主要な規制当局の要件は、地域ごとに異なるだけでなく、技術や市場の動向に応じて変化し得る。これらに迅速かつ正確

に対応するためには、余裕を持った資金計画を構築し、規制対応を含む包括的な戦略を策定する必要がある。

さらに、各段階での資金調達の成功は、次のフェーズにおける資金調達活動を容易にするだけでなく、プロジェクト全体の信頼性と市場での価値を高める呼び水となると考えられる。例えば、基礎研究段階で得られた助成金の実績や試作段階での成功は、臨床試験や製品化に向けた投資家や支援企業からの関心を引きつける重要な要因となる。このように段階的な成功を積み重ねることで、規制対応と資金調達の両面でプロジェクトを着実に前進させることが可能となる。したがって、規制環境の変化を常に念頭に置きつつ、柔軟性を持った資金戦略を構築し、各段階における成果を最大限活用してプロジェクトの価値を高めることが、最終的な製品化と市場投入の成功に直結する鍵であると考えられる。

5.5.3. 助成金・補助金と他人資本・自己資本との違い

研究開発を推進する上で、開発期間中に継続的な資金を調達することは極めて重要な課題である。また単に学術的な研究にとどまらず、その後のビジネス展開までを考える場合には特に、プロジェクトのフェーズと目的に応じて助成金・補助金と他人資本を適切に使い分けることが求められる。これらの資金源は提供目的や条件に大きな差異があり、その特性を理解し活用することが調達の成功に影響する。

助成金や補助金は、主に政府機関や地方自治体、公益財団から提供される返済不要の資金である。特定の研究開発や技術革新を促進する目的で交付され、プロジェクトの初期段階での資金確保に適している。返済義務がないため、リスクを抑えつつ研究を進めることが可能で、研究者の自主性を保ちながら資金を使用できる。しかし申請には審査基準があり、資金の使用用途に細かい制限が設けられる場合が多い。また定期的な進捗報告や詳細な資金使用報告が求められ、プロジェクトの自由度が一定程度制約されることもある。

一方、他人資本と呼ばれる銀行借入や自己資本と呼ばれるベンチャーキャピタルや民間投資家からの資金提供は、プロジェクトの成長性や収益性を期待した投資である。大規模な資金を調達でき、資金の使途においても自由度が高い。資金面だけでなく、経営に関する専門的な助言や、社会関係資本の提供などの包括的なビジネス推進のサポートも得られる。しかし、対価として株式の一部譲渡や利益の分配を求められることが一般的であり、投資家からの研究内容や方向性、経営参画や意思決定への影響が生じる可能性がある。また、短期的な収益性や成長性に対するプレッシャーが増すことも考慮すべきである。

本プロジェクトでは、開発段階がまだ初期であり、収益化の見通しも明確でないため、現段階では外部資本の導入は適切ではないと判断した。将来的に製品化や事業化の段階に進んだ際には、外部資本の導入も視野に入れる必要があると考えられたが、現時点では助成金や補助金を最大限に活用し、研究の基盤をしっかりと築くことが最優先であると判断した。銀行は貸付金の回収を、大部分の投資家は早期の収益化や事業拡大による投入した資本の回収を期待するため、研究開発の自由度が制限される可能性が未知数であった。そのため主に助成金や民間の補助金を活用して研究を進めてきた。これらの資金は試作機の開発や基礎研究の深化に大いに役立ち、研究の進展に不可欠であった。資金調達の手段を適切に選択し、プロジェクトの状況に最適な戦略を立てることが、学術的新規性を社会実装する上での1つの要点であると考えられる。

5.5.4 学術領域とビジネス領域の求められるコミュニケーションの違い

本研究における研究開発費の大部分を助成金や補助金による資金調達で賄ったと記述したが、これらの獲得に際して、それまで筆者が経験してきた学術論文や学会発表とは異なるアプローチが求められていることを強く実感した。

一般的に、学術研究の場では、客観的なデータと論理的な考察に基づき、明確に実証された事実のみを伝えることを求められる。曖昧な憶測や科学的な裏付けのない仮定を積み重ねることは忌避され、厳密な検証が重視される。しかし、上記のような資金調達の場面では、現場が直面している深刻な問題を強調し、それを解決するための未実現のアイデアや取り組みへの熱意を如何に伝えるかが重要である。感染症

診断の現場が抱える課題や、抗菌薬耐性菌の増加による社会的リスクを大きく取り上げ、その解決策として自家蛍光を用いた迅速細菌検査デバイスの開発がいかにより有用であることを強調する必要があった。自分たちの研究が将来どのように社会を変革し、医療現場に貢献できるかを説得力を持って伝えることを求められた。また、研究が実現した際の社会的インパクトや貢献度を具体的な数値や事例を交えて示すことで、審査員にプロジェクトの価値を強く訴求できるということを実感した。

このようなプレゼンテーションスタイルの切り替えは、当初学術的な領域における価値観のみしか持たない筆者にとって大きな困難を伴った。研究者としての客観性を保ちつつ、情熱的かつ説得力のある言葉でプロジェクトの意義を伝える経験が不足していたため、資料作りから発表の言葉遣い、抑揚、立ち居振る舞いなどで多くの指導を受ける必要があった。長期間にわたって形成された価値観を修正することはある程度の時間を要したが、多くの申請書の作成、プレゼンテーション、そしてそれらに対するフィードバックを受ける中で、徐々に効果的な表現方法やアピールポイントを掴むことができた。その結果、多くの助成金や補助金を獲得し、研究を継続的に進めるための資金を確保することができた。

振り返ってみて、筆者にとって認識すべき重要だったポイントは、聴衆に対して研究の背景と社会的意義を理解し易い言葉に翻訳して明確に示し、結果と考察から導かれるさらにその先の実現可能性をわかりやすく表現することであった。学術領域のコミュニケーションでは、多くの場合、聴衆は同じ領域の研究者であり、共通のバックグラウンドやニーズを理解している。そのため、一人ひとりが確認できた小さな事実の確実性を審査し、それを少しずつ積み上げて領域全体の進歩につなげていくという共通認識がある。一方でビジネスにおけるコミュニケーションでは、バックグラウンドも背景知識のレベルも全く異なる多様な聴衆に対して、自分の取り組みの立ち位置を平易な言葉で説明する必要がある。それを聞いた聴衆が彼らの持つ金銭的、物的、人的な資源を提供してくれるかどうかは、彼らの資源を活用して話し手がどのように社会的価値を創出し、将来的にどのような影響を与えることができるのか、その具体的なビジョンと、そこに至るまでのプロセスの妥当性を納得してもらえるかに左右されるため、その点を強調して示さなければならなかった。

本研究の場合には現在がどのような状況で、どのような問題があり、現場ではどのようなことが求められているか、プロジェクトが実現すれば医療現場でどのような変革が起こり、それが患者や医療従事者にどれほどの恩恵を与えることができるかを詳細に描写し説明した。これらを研究の進捗状況や開発計画を具体的に説明しながら、実現可能性を裏付けるデータや技術的優位性を具体的に示すことで、審査する側の信頼と納得を得ることができた。

本研究における資金調達の経験を通じて、学術領域とビジネス領域で求められるコミュニケーションの差異を実践的に理解することができた。研究者としての客観性と科学的厳密性を維持しつつ、ビジネス的な視点での説得力を持ったプレゼンテーションをできる能力が、プロジェクトの資金調達の成功には不可欠であることを実感した。

5.6. 新規事業創出に向けた支援リソースの活用

本節では、新規事業をサポートする行政や民間企業の支援の中で、自身がこれまでに利用したものについてそれを通した学びと経験を振り返る。

5.6.1. 起業家を支援する様々な制度

新たなビジネスを立ち上げ、それを持続的に成長させるために、多様な支援制度を積極的に活用していくことが推奨される³⁶。日本国内では、政府機関、地方自治体、大学・研究機関、民間団体などが提供する多種多様な支援プログラムが存在し、技術革新を目指すスタートアップにとって重要なリソースとなっている（図5-3）³⁷。

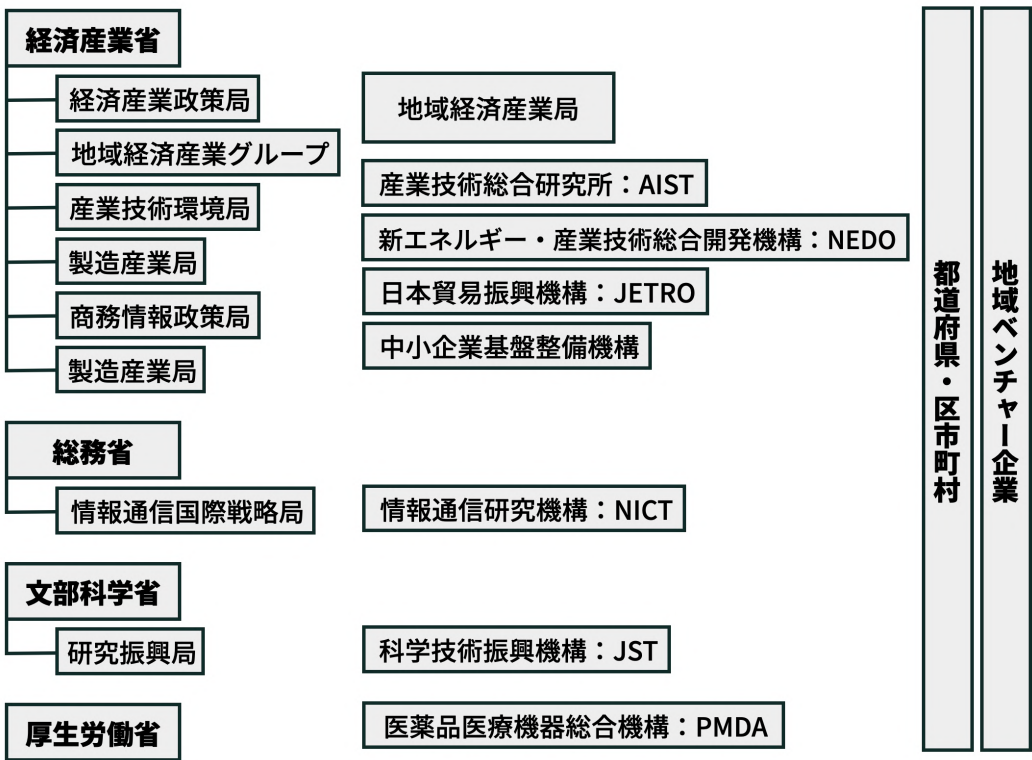


図5-4 日本のベンチャー支援体制（文献37から引用）

政府の取り組みとして、経済産業省はスタートアップ企業の成長を直接支援する補助金や融資、また投資家・研究機関・大学・自治体の活動を後押しする税制や制度など、総計69の支援策を取りまとめている³⁸。また、内閣府は「スタートアップ・エコシステム拠点都市」を選定し、大学・自治体・産業界のリソースを結集して、大学発スタートアップの創出やその基盤となる人材育成に取り組んでいる³⁹。さらに、厚生労働省はヘルスケア分野のスタートアップを支援するため、「ヘルスケアスタートアップ等の振興・支援策検討プロジェクトチーム」を設置し、具体的な支援策の策定を進めている⁴⁰。

地方自治体による創業支援制度も、地域経済の活性化と新規事業の立ち上げにおいて重要な役割を果たしている。例えば、東京都が実施している「特定創業支援等事業」では、創業者に対する資金援助や事業支援サービスが包括的に提供されており、具体的には創業準備費用の補助、オフィススペースの提供、メンタリングプログラムの実施といった支援が含まれる。筆者の所屬地域でも自治体が独自の創業支援プログラムを展開しており、地域産業との連携を強化するためのマッチングイベントの提供があった。

また、民間企業や非営利団体が運営するインキュベーション施設やアクセラレーターも、起業家にとって重要なリソースである。これらの施設ではオフィススペースの提供だけでなく、ビジネス指導、資金調達の支援などが行われており、ネットワーキングの機会も豊富である。特に規制とその改定の頻度が多く外部からの新規参入者が情報を得にくい医療業界では、これら医療機器開発に特化したアクセラレーター

において専門的な知識やリソースを得ることができる。また海外市場への進出や国際的な研究開発を検討している場合には日本貿易振興機構（JETRO）の国際展開支援を活用することで、実証事業の支援を通じて海外の企業や市場との連携を強化することが可能である⁴¹。

研究開発に主眼を置いた支援もスタートアップにとって重要である。科学技術振興機構（JST）、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）、日本医療研究開発機構（AMED）などの機関が提供するプログラムは、技術開発を強力にサポートしている。特に医療機器開発においては、AMEDの支援プログラムが有用であり、研究開発プロジェクトから医療機器としての承認や臨床治験も含めた各フェーズでの資金調達を支援している⁴²。

資金調達に関連した支援制度も多岐にわたる。例えば、経済産業省が実施する「ものづくり補助金」は、中小企業や小規模事業者を対象に、新製品や新サービスの開発、プロセス改善に必要な設備投資を補助するものであり、最大で1億円の補助金が提供される⁴³。また、日本政策金融公庫の「創業融資制度」は、新規開業者や事業開始後間もない企業を対象に、事業計画や成長戦略を基に無担保・無保証人で融資するもので、スタートアップにとって初期段階での資金調達のハードルを下げる重要な役割を果たしている⁴⁴。自治体や商工会議所も独自の補助金や助成金制度を展開しており、地域密着型の支援を通じてスタートアップの成長を後押ししている⁴⁵。これらの支援制度は、資金調達の選択肢を広げ、事業基盤の強化に大きく貢献している。

これら多様な支援制度を戦略的に活用することで、資金調達や技術開発、事業運営における課題を克服し、持続的な成長を実現することができる。事業段階や必要とするリソースに応じて複数の支援制度を組み合わせることが、効果的な事業展開につながると考えている。ほとんどの起業家は創業直後から多くの課題に直面するが、これらの支援を適切に選択することでビジネスモデルの構築において不確実性を減らし、実現可能性を高めることができると考えられる。

5.6.2. 経済産業省の「始動」プログラム

経済産業省が主導する「始動 Next Innovator」プログラムは、日本の技術革新を牽引する起業家を支援し、次世代のイノベーションリーダーを育成することを目的として2015年度に設立された。本プログラムは、日本の高い技術力と研究開発能力を活かし、新たな産業の創出と国際的な地位の向上を図る必要性を背景に、日本のイノベーションエコシステムを強化し、グローバル競争力を持つスタートアップの育成を目指している。開始以来、1000名超の多様なイントレプレナー（社内起業家）やアントレプレナー（起業家）を輩出してきた実績があり、参加者は、国内外で活躍する講師やメンターとともに実践的な活動を行い、必要な知識やスキルを経験的に習得し、イノベーターとしての資質を養うことが期待されている。

筆者自身、2022年にこのプログラムに参加する機会を得た。参加プロセスはオンライン申請書と事業計画書の提出から始まり、書類審査と面接審査を経て選抜されたチームが参加する形式であった。選考基準には、技術の革新性、市場性、チームの実行力、事業の持続可能性、グローバル展開の可能性などが含まれていた。プログラム期間中の約3ヶ月間、隔週末の2日間ずつ、多岐にわたる分野のワークショップやセミナー、メンタリングセッションに参加した。

特に印象的であったのは、経験豊富な起業家や業界の第一線で活躍する専門家とのメンタリングである。このメンタリングでは、現場で培われた実践的な知識やスキルについて、直接的かつ具体的な指導を受けることができた。たとえば、個別のビジネスモデルや事業計画の検証、対象市場の分析手法、さらには資金調達戦略の立案に至るまで、多岐にわたるアドバイスを獲得する機会を得た。これらの指導は、それぞれの専門家が持つ多様な実務経験に裏打ちされており、単なる理論に留まらず実際の事業運営に即した内容であった。そのため、これらの経験を通じて得た知識やスキルは、金銭的な価値では測ることのできない意義を持ったものであったと実感するし、また事業計画策定において極めて重要な役割を果たした。

また、海外のベンチャーキャピタリスト（VC）との対話機会も提供され、グローバル市場での事業展開について具体的なフィードバックを得ることができた。特に、医療機器分野での規制対応や市場参入戦略についてのアドバイスは、プロジェクトのリスク管理の面で非常に有用であった。

他の参加者との交流も大きな学びとなった。異業種からの視点やアイデアを共有することで、ビジネスモデルを客観的に見直す機会となった。また、新規事業立ち上げの前後という、将来の不確実性に対する不安感や恐怖心が多い段階において、共通の課題や悩みを持つ起業家同士で情報交換を行うことで心理的なサポートを得ることができた。

またプログラムの集大成としてピッチコンテストが開催され、そこで評価を受けた結果、シリコンバレーでの短期研修に参加する機会を得た。この研修では、現地のスタートアップや投資家との交流を通じて、最先端の技術動向やビジネスモデル、またマインドセットを学ぶことができた。世界の中でも起業家たちが日々鎔を削るシリコンバレーのスピード感やチャレンジ精神に触れ、国際的な視野を広げる貴重な経験となった。

これらの研修を通して得られた知見を基にビジネスモデルや技術開発計画を再構築し、グローバル展開を視野に入れた戦略をより具体化させアップデートすることができた。また研修によって得られた国際的なネットワークを活用して、海外の企業や投資家との社会関係資本も得ることができた。「始動 Next Innovator」プログラムへの参加は、起業家として必要な知識やスキルを体系的に習得できただけでなく、異業種との対話を通して価値観を広げるとともに、近いビジネスステージの者同士の交流によって精神的な安定感を得ることができるということを経験する絶好の機会であった。

5.6.3. JETROのドイツ出展&ビジネスアテンド支援事業

日本貿易振興機構（JETRO）が提供する海外進出支援プログラムは、海外市場への進出を目指す中小企業にとって貴重かつ強力な支援である。JETRO全体で包括的に支援すると同時に、各支部が地域の産業特性に合わせたプログラムを企画している。例えば、筆者が所属する大学院が位置する浜松市では、光技術に関するものづくり企業が多く存在するため、光技術に特化した展示会であるPhotonics Daysへの出展支援や、現地企業・研究機関とのビジネスマッチングを通じて、日本企業が欧州市場でのビジネスチャンスを最大限に活用できるようなサポートが提供されている。今回のビジネスにおいて、これらの支援を活用することができた。

ドイツは欧州圏における最大の経済大国であり、従来から光学技術や医療機器分野で高い技術力と産業競争力を持つ市場である。私が開発を進めている自家蛍光分光計測デバイスにとっても、ドイツの研究機関やスタートアップと共同で学術研究や協業を行い、それらを足がかりにEU市場へ進出することは、技術革新とビジネス拡大の双方で重要なステップであった。しかし、言語や文化の違い、現地市場の理解不足といった課題が存在し、それらを克服するための支援が必要であった。

JETROの支援を受けて、Photonics Daysへの出展を実現することができた。展示ブースの設営やプロモーション資料の作成、展示内容の調整など、出展に関する実務的なサポートを受けた。また、JETROの担当者は商談設定やネットワーキングイベントの開催、現地投資家によるメンタリングをサポートし、現地企業や研究機関、投資家との交流を促進することができた。さらに、ドイツの大学都市の一つであるイエナを訪問し、光学に関する研究機関やスタートアップ企業を訪問した。現地の研究者や起業家との交流を通じて、最新の技術動向や研究開発の現状を直接知ることができ、技術開発と事業戦略の両面で大きな示唆を得た。

本プログラムへの参加により、欧州市場に関する実践的な知見を得ることができた。CEマーキング取得プロセスの理解や欧州における価格戦略、市場参入戦略の具体化など、事業展開に必要な知識を深めることができた。また、現地の光学関連企業や研究機関とのネットワーキングを通じて、共同研究や技術提携の可能性を探り、新たなビジネスパートナーシップの構築に向けて前進することができた。技術面では、欧州の技術動向を把握する上で多くの気づきを得た。これらを基に、製品仕様の最適化や研究開発計画の見直し、知的財産戦略の再検討を行うことができた。

プログラム参加を通じて得られた教訓は、今後の事業展開において極めて有益である。特に製品開発の観点から、欧州市場向けの仕様検討や規制対応の重要性、事前準備の必要性を再認識する機会となった。欧州圏では規制が厳格であり、市販後の対応を含めた品質管理システムの整備やドキュメン

ト管理の徹底が不可欠であることが明確になった。また、各国における認証基準の特性やその差異についても理解を深めることができた。

JETROの海外進出支援プログラムを活用することで、現地市場での認知度向上や新たなビジネスチャンスの獲得を通じて、国際的な事業展開を加速させる可能性が広がる。この支援事業は、単なる市場進出の促進にとどまらず、研究開発活動における技術の商業化や国際市場での競争力強化にも寄与するものである。得られた成果は、技術革新を追求する起業家にとって重要な指針となるだけでなく、グローバル市場での持続可能な成長基盤の構築にも資するものであった。

5.6.4. MEDISOの医療系ベンチャー・トータルサポート事業

MEDISO (Medical Innovation Support Organization) は、厚生労働省が推進する医療系ベンチャー企業向けの包括的支援プログラム「医療系ベンチャー・トータルサポート事業」を提供している。このプログラムは、医療分野で革新的な技術やサービスの開発を目指すスタートアップや中小企業を対象とし、規制対応、技術支援、ビジネス開発支援など多角的なサポートを行うことを目的としている。

細菌の自家蛍光分光計測デバイスのビジネス化に向け、上市を目指す初期段階で、国内外の医療機器に関する薬事規制の専門知識が不足していることを痛感していた。特に、日本および海外の医療機器関連の法制度は複雑で、その理解と適切な対応が製品開発と市場投入の鍵となると考えられた。これらの課題を克服するためにMEDISOの支援面談を受けた。

MEDISOでは、薬事に関する専門的なアドバイスや実践的なサポートを提供している。まず、医療機器のクラス分類について詳細な説明を受け、デバイスが該当するクラスを明確にすることができた。これは、承認申請や認証取得のプロセスを計画する上で極めて重要なステップであった。クラス分類に基づき、最適な承認・認証取得の戦略を策定し、効率的な申請プロセスを設計することが可能となった。また、国内外の規制要件を理解し、それに適合する製品設計やドキュメント作成が可能になった。特に、技術文書やリスクマネジメントファイルの整備において具体的な指導を受け、製品の安全性と有効性を確保するための体制を構築できた。

さらに、日本の薬機法だけでなく、欧州のMDRや米国のFDAの規制についても、専門家との複数回のミーティングを通じて深く学ぶ機会を得た。その結果、各国の規制要件や申請手続きの違いを理解し、グローバル展開に向けた戦略を立てることが可能となった。また、実際に起業しこれらの許認可を取得する場合の手順や必要な設備、人員についても、実践的かつ具体的に指導を受けた。例えば、品質管理システム(QMS)の構築やISO 13485の認証取得に必要なプロセス、専門の薬事担当者の配置、潜在的な落とし穴など、具体的な要件を把握することができた。また、それらが実際にどの程度の困難さを伴うのか、時間的・経済的なコストがどれほどかかるのかについても、現実的な見積もりを得ることができた。

また日本国内における医療機器企業の設立に必要な手順や準備事項についても理解を深めることができた。資本金の設定、人員配置、設備投資など、起業に伴う具体的な課題を洗い出し、対策を講じることができた。また、許認可取得に伴うリスクやコストを具体的に算出し、事業計画に反映することができた。これにより、投資家や協業企業への説明責任を果たしやすくなった。

MEDISOの支援を通じて得た知見と経験、特に薬事規制への適切な対応は、医療機器の安全性と有効性を確保し、信頼性の高い製品を提供するための組織内部の構造を構築する上で重要であると感じた。

5.6.5. 都道府県の特定創業支援

都道府県が提供する特定創業支援は、地域における起業活動を促進すると同時に起業したばかりの企業を持続的な発展を目指すプログラムである。ビジネスの実践を進める中で、法人を設立し事業を展開する段階においてこの地方自治体の提供する特定創業支援を活用した。この支援では起業前の個人に対し、自治体から委託された中小企業診断士が担当者として派遣される。

彼らの指導のもと、実際の事業計画書を作成し、特に起業初年度および第二年度において資金繰りに困ることが多い点を踏まえ、地元の地方銀行や政策金融公庫からの融資を受けるためのポイントや、金融機

関が重視する評価基準等について、ビジネスに適した具体的なアドバイスを受けた。これらの指導を通じて、期首から期末までの資金繰りや原材料費の管理方法、他企業との実際の支払いに関する手法など、実践的な知識を習得することができた。また、予測されるキャッシュフロー計算書の作成や資金不足を回避するための予測と対策を学び、財務的な健全性を維持するための実践的なスキルを身につけることができた。さらに、取引先との契約交渉や価格設定、納期管理など、実務的な取引に関するノウハウを得ることができた。信頼関係を構築し、長期的なビジネスパートナーシップを築くためのコミュニケーション方法やトラブルシューティングの手法も学習した。

また、地域の経営者や起業家との交流イベントに参加し、人脈を広げる機会も得られた。他業種の経営者からの意見や助言を受け、自身の事業運営に新たな視点を取り入れることができた。さらに、国や行政との許認可手続きや、自治体の助成金・補助金に関する実務的なサポートも適時受けることができた。

特定創業支援を活用することで、事業運営の初期段階において必要な実務的なスキルと知識を総合的に習得することができた。この支援を通じて、事業計画の具体化やより現実的な資金調達手法、ネットワーキングなど、色々な方面で成果を得ることができた。

5.7. まとめ

本章では、自家蛍光分光計測技術を用いた細菌迅速検査デバイスの市場展開と実用化に向けた戦略を総合的に論じた。

まず初めに、市場分析を通じて、感染症診断の現場が直面する具体的な課題やニーズを明確にし、本デバイスが提供する価値と競争優位性を評価した。その結果、抗菌薬耐性菌の増加や適切な抗菌薬選択の必要性が高まる中、迅速かつ正確な細菌同定と抗菌薬感受性試験を可能にする本デバイスの市場潜在性の大きさを示した。また、既存の競合製品の利点と課題を総合的に把握し、自家蛍光分光計測技術を用いた新たなアプローチが、迅速性、精度、コスト効率の面で優位性を持つことを示した。

次に、ビジネスプランの策定において、具体的なビジネスモデルの構築、収益予測の詳細化、開発から市場投入までのスケジュールの設定、マイルストーンの明確化、パートナーシップの構築など、事業計画を詳細に立案した。現場で働く一員としての視点を持って市場のニーズを的確に捉え、産学連携やベンチャーキャピタルからの資金調達、クラウドファンディングの活用など、多角的な資金調達について将来的なステージにおける戦略を検討し、持続可能な事業運営の基盤を築くための計画を策定した。

また、医療機器市場への参入に不可欠な法的要件とリスク管理についても詳細に考察した。日本の薬機法、欧州のMDR・IVDR、米国のFDA規制など、国内外の規制環境を理解し、それぞれの承認・認証プロセスや国際規格への適合性を確保するために将来的に必要となるであろう具体的な対策について検討した。新規参入者が直面する課題として許認可取得のための専門知識やリソースの不足が挙げられたが、様々な参入支援プログラムを活用することで、これらの課題を克服できる可能性があることを見出した。

さらに、研究開発費の確保と持続的な資金戦略について論じた。助成金や補助金の活用と外部資本との違いを理解し、プロジェクトのフェーズに応じた最適な資金調達手段を選択することの重要性を再度確認した。初期段階では助成金や補助金を最大限に活用し、研究の自由度を維持しながら基盤を固める戦略を採用し、一方、事業化の段階に進んだ際には、外部資本の導入も視野に入れ、長期的な資金確保戦略を構築する必要性を指摘した。また、学術領域とビジネス領域で求められるコミュニケーションの違いを経験的に学び、資金調達の成功に向けてどのようなスキルが求められるかということについて実践を通して理解することができた。

最後に、新規事業創出に向けた支援リソースの活用について、自身が参加したプログラムや得られた経験を振り返った。経済産業省の「始動」プログラム、JETROの海外進出支援、MEDISOのトータルサポート事業、地方自治体の特定創業支援などを通じて、技術開発のみならずビジネス戦略の構築、国際的なネットワークの形成、法規制への対応力の向上など、ビジネスプランを実際に運用していく上での基盤を構築することができた。

ここまで述べた事業実践を通じて、本デバイスの実用化に向けた具体的な課題と解決策を明確にすることができた。特に、技術的な優位性を最大限に活かしつつ、市場のニーズに適合した製品開発を進めるためには、継続的な改良とユーザーからのフィードバックが不可欠であることを認識した。また、法規制や資金調達などのビジネス面での課題に対しても、多様な支援リソースを効果的に活用することで、効率的な対応が可能であることを確認した。今後は、これらの知見を基に実用化への具体的なステップを踏み出し、社会に貢献できる製品の開発と市場展開を積極的に推進していきたい。

-
- ¹ Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. JAMA. 2008;299(2).
 - ² Drain PK, Hyle EP, Noubary F, Freedberg KA, Wilson D, Bishai WR, Rodriguez W, Bassett IV. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. Lancet Infect Dis. 2014 Mar;14(3):239-49.
 - ³ Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318-327.
 - ⁴ O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. 2016.
 - ⁵ Zhuang Z, Lai X, Sun J, et al. Mapping and forecasting the global spread of COVID-19 pandemic: challenges and implications for global health governance. BMC Med. 2022;20(1):106.
 - ⁶ 2023 臨床検査市場 No.3(細菌検査・遺伝子検査・POC検査・病理検査・新型コロナウイルス検査)、富士経済。
 - ⁷ 2023 有力臨床検査企業戦略・業界トレンド分析、富士経済。
 - ⁸ Kramer DB, Xu S, Kesselheim AS. Regulation of medical devices in the United States and European Union. N Engl J Med. 2012;366(9):848-855.
 - ⁹ AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング-超早期パンデミック検査・超早期診断・POCTから健康長寿社会へ-, シーエムシー出版。
 - ¹⁰ Jani IV, Peter TF. How point-of-care testing could drive innovation in global health. N Engl J Med. 2013;368:2319-2324.
 - ¹¹ Kasoju N, Remya NS, Sasi R, Sujesh S, Soman B, Kesavadas C, Muraleedharan CV, Varma PRH, Behari S. Digital health: trends, opportunities and challenges in medical devices, pharma and bio-technology. CSIT. 2023;11(1):11-30.
 - ¹² Brönneke JB, Müller J, Mouratis K, Hagen J, Stern AD. Regulatory, Legal, and Market Aspects of Smart Wearables for Cardiac Monitoring. Sensors. 2021;21(14):4937.
 - ¹³ Kashyap PC, Chia N, Nelson H, Segal E, Elinav E. Microbiome at the Frontier of Personalized Medicine. Mayo Clin Proc. 2017;92(12):1855-1864.
 - ¹⁴ Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and Financial Benefits of Rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1415-1418.
 - ¹⁵ 厚生労働省経済産業省「医療機器の海外展開について」：<https://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryoku/kaihatsu/dai4/siryoku8.pdf> (2024/11/12アクセス)。
 - ¹⁶ 薬事日報社「【2024年年頭所感】生活者を中心としたセルフメディケーションの環境整備 - OTC薬協会長」：<https://www.yakuji.co.jp/entry107538.html> (2024/11/12アクセス)。
 - ¹⁷ BIOMÉRIEUX (VITEK®)：<https://www.biomerieux-industry.com/ja/products/vitek-2-compact-for-food> (2024/11/5アクセス)

-
- ¹⁸ BD(バクテック™ FXシステム) : <https://www.bd.com/ja-jp/products-and-solutions/products/product-families/bd-bactec-fx-blood-culture-system>(2024/11/5アクセス)
- ¹⁹ Thermo Fisher Scientific(Applied Biosystemsシリーズ) : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html> (2024/11/5アクセス)
- ²⁰ Beckman Coulter(GeneXpert®システム) : <https://www.beckmancoulter.co.jp/dx/product/molecular-diagnostics/GeneXpert/> (2024/11/5アクセス)
- ²¹ Abbot(2021年2月1日プレスリリース) : <https://www.abbott.co.jp/media-center/press-releases/02-01-2021.html> (2024/11/5アクセス)
- ²² Wang H, Zhang W, Tang YW. Clinical microbiology in detection and identification of emerging microbial pathogens: past, present and future. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):2579-2589.
- ²³ 小松 方. MALDI-TOF MS を用いた臨床微生物学的検査の新しい潮流 原理から臨床応用まで. *日本臨床微生物学会雑誌*. 2016;26(2):79-86.
- ²⁴ D'Onofrio V, Salimans L, Bedenić B, Cartuyvels R, Barišić I, Gyssens IC. The clinical impact of rapid molecular microbiological diagnostics for pathogen and resistance gene identification in patients with sepsis: a systematic review. *Open Forum Infectious Diseases*. 2020;7(10)
- ²⁵ Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):337-348.
- ²⁶ Wozniak-Biel A, Bugla-Ploskonska G, Korzekwa K, et al. Current and Future Flow Cytometry Applications Contributing to Antimicrobial Resistance Detection in Clinical and Environmental Settings. *Microorganisms*. 2023;11(5):1243. Published 2023 May 16.
- ²⁷ 厚生労働省. 診療報酬点数表 (令和4年度改定). 医科 > 第2章 特掲診療料 > 第3部 検査 > 第1節 検体検査料 > 第1款 検体検査実施料 > 微生物学的検査 > D018 細菌培養同定検査.
- ²⁸ 厚生労働省. 診療報酬点数表 (令和4年度改定). 医科 > 第2章 特掲診療料 > 第3部 検査 > 第1節 検体検査料 > 第1款 検体検査実施料 > 微生物学的検査 > D019 細菌薬剤感受性検査.
- ²⁹ 厚生労働省「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬機法）」 : <https://www.mhlw.go.jp/content/000693248.pdf> (2024/11/13アクセス) .
- ³⁰ 経済産業省「医療機器産業を取り巻く課題について」 : https://www.meti.go.jp/shingikai/mono_info_service/medical_device/pdf/001_06_00.pdf (2024/11/13アクセス) .
- ³¹ 厚生労働省「ヘルスケアスタートアップの振興・支援に関するホワイトペーパー」 : <https://www.mhlw.go.jp/content/10807000/001268475.pdf> (2024/11/13アクセス) .
- ³² Kheir O, Smedts S, Jacoby A, Verwulgen S. Efficient Quality Management in MedTech Start-Ups (Based on ISO 13485). *Med Devices*. 2021 Oct 15;14:313-319.
- ³³ Kheir O, Jacoby A, Verwulgen S. Risk Identification and Analysis in the Development of Medical Devices Among Start-Ups: Towards a Broader Risk Management Framework. *Med Devices* . 2022 Sep 19;15:349-363.
- ³⁴ Gad SC, McCord MG. Safety Evaluation in the Development of Medical Devices and Combination Products. 3rd ed. Springer International Publishing; 2008.
- ³⁵ International Electrotechnical Commission. IEC 62304:2006+AMD1:2015 CSV Consolidated version: Medical device software - Software life cycle processes. IEC; 2015.
- ³⁶ Fichter K, Tiemann I. Impacts of promoting sustainable entrepreneurship in generic business plan competitions. *J Clean Prod*. 2020;267:122076.
- ³⁷ 松田修一研究室 [日本のイノベーションIII ベンチャー支援ダイナミズム]白桃書房、2011.

-
- ³⁸ 経済産業省「METI Startup Policies ～経済産業省スタートアップ支援策一覧～」： https://www.meti.go.jp/policy/newbusiness/meti_startup_policies.html（2024/11/27アクセス）。
- ³⁹ 文部科学省「大学等でのスタートアップ創出について」： https://www.cas.go.jp/jp/seisaku/atarashii_sihonsyugi/wgkaisai/startup_dai5/siryou5.pdf（2024/11/27アクセス）。
- ⁴⁰ 厚生労働省「ヘルスケアスタートアップ等の振興・支援策検討プロジェクトチーム」：（2024/11/27アクセス）。
- ⁴¹ 日本貿易振興機構「中堅・中小企業の海外展開支援」：（2024/11/27アクセス）。
- ⁴² 国立研究開発法人日本医療研究開発機構「医療機器開発推進研究事業」：（2024/11/27アクセス）。
- ⁴³ ものづくり補助金事務局「ものづくり・商業・サービス生産性向上促進事業 公募要領 概要版（18次締切）」：（2024/11/27アクセス）。
- ⁴⁴ 日本政策金融公庫「創業融資のご案内」：（2024/11/27アクセス）。
- ⁴⁵ 総務省「ローカルスタートアップ支援制度 一起業や新規事業の支援に取り組む自治体を応援」：（2024/11/27アクセス）。

6. 結論

6.1. 研究の総括

本研究は、感染症診断の迅速化と精度向上を目的として、細菌の自家蛍光特性と機械学習を組み合わせ、新たな細菌種同定手法の開発と、低コスト・高性能な蛍光計測装置の実用化を目指したものである。近年、抗菌薬耐性菌の増加や新興感染症の出現により、迅速かつ正確な細菌検査の必要性が高まっている。しかし、従来の培養法やPCR法は時間とコストの面で課題があり、臨床現場での即時対応が困難であった。

本研究では、まず主要な細菌種の自家蛍光スペクトルを測定し、菌種間の特異的なスペクトルパターンを明らかにした。これにより、自家蛍光を用いた菌種同定の可能性を示した。次に、取得したデータを用いて機械学習アルゴリズムを適用し、高精度な菌種分類モデルを構築し、ハードウェアの制約を前提とした効率的な解析方法を模索した。

さらに、実用化に向けてLED光源を用いた低コスト・高性能な蛍光計測装置を試作し、光学系の設計、検出器の選定、信号処理の最適化を行った。装置の小型化と操作性の向上を実現し、リアルタイムでの菌種同定を可能とした。装置の市販化を見据えた試作機の製造や性能評価を行い、医療現場での使用に適したデザインや機能について検討した。

ビジネス面では、市場分析を通じて細菌迅速検査市場の動向や競合製品の状況を把握し、本手法の競争優位性を明確化した。ビジネスプランを策定し、ターゲット市場の設定、収益予測、資金調達戦略、マーケティング戦略を具体化した。また、起業家支援プログラムへの参加により、事業計画の精緻化やネットワークの構築を進め、製品の実用化と市場投入に向けた具体的な道筋を描くことができた。

本研究の成果は、感染症治療における迅速かつ正確な細菌検査を可能にし、適切な抗菌薬の早期投与や耐性菌の拡大防止に寄与する技術である。低コストで操作が簡便な装置を開発することで、資源の限られた地域や小規模医療機関でも高度な細菌検査が可能となり、医療現場の課題解決や産業界の発展に大きく貢献することができる。さらに、革新的な製品の投入により医療機器市場の活性化や技術革新を促し、日本発信の医療技術として本邦の国際的なプレゼンスを高めることができる。

6.2. 結論

本研究は、細菌の自家蛍光特性と機械学習を融合した新しい細菌種同定手法を提案し、その有効性を実証した。光学測定と機械学習による解析から、ハードウェアの制約を前提とした効率的な分析手法を確立し、従来の方法では困難であった迅速かつ高精度な菌種同定手法を開発した。また、医師として主体的に光学的な開発に携わることで、臨床現場のニーズを直接反映した実用的なデバイスの創出の可能性を提示した。

さらに本研究では、装置の試作を通じて実装上の課題や設計上の要件を整理することで、臨床現場に適したハードウェアの検討指針を提示できた。薬事承認に向けた性能評価や品質管理体制の構築についても議論し、市場分析を通じて製品の競争優位性と事業化のロードマップを策定した。装置の小型化や低コスト化を進め、厳格な性能評価試験と品質管理体制の整備を計画することで、感染症診断の迅速化に資する技術を実際の臨床応用へと近づけることができ、その具体的展開に向けた開発戦略を示すことができた。

本研究で構築した分光技術を用いた菌種同定の枠組みは、単なる診断応用にとどまらず、それを基にした市場分析や事業実践を通じて、収益性のあるビジネス構築を目指している。この過程自体が、光産業創成そのものであり、今後の高度な光学分析や機器開発を通じて、新たな光産業の発展に資するものである。

6.3. 研究の限界と今後の展望

本研究にはいくつかの課題と限界が存在する。技術的課題として、検出感度のさらなる向上や測定時間のさらなる短縮が挙げられる。臨床サンプル中の細菌濃度は低い場合が多く、高感度な検出が求められる。また、測定プロセスの高速化により、緊急を要する感染症への迅速対応が可能となる。

機械学習モデルの汎化性能についても、さらなる検証と改善が必要である。多様な細菌株や臨床サンプルからデータを収集し、モデルの精度と信頼性を向上させる必要がある。環境要因や培養条件がスペクトルに与える影響を詳細に解析し、モデルの頑健性を高めることも求められる。装置の実用化に向けては、長期的な安定性や耐久性、医療現場での使い勝手の検証が必要である。医療機器としての規制要件や認証取得のプロセスもクリアしなければならない。

今後は、これらの課題を克服し、技術的な改良と応用分野の拡大を進めることで、本研究を基盤とした製品の実用化と社会実装により、公衆衛生の向上や感染症診療の革新に大きく寄与することを目指す。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々から多大なるご指導とご支援を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

まず、光産業創成大学院大学 光情報・システム分野の石井勝弘教授（指導教員）には、光学の基礎から応用に至る幅広い学術的知見とともに、プログラミングについてや、光学シミュレーションに関する詳細かつ具体的なアドバイスを賜りました。さらに試作段階での技術的助言や、論文執筆における的確な指導を細かにいただき、心より御礼申し上げます。

続いて、バイオフィotonicsデザイン分野の江田英雄前教授（指導教員、現広島工業大学教授）には、研究の初期段階において方向性を定める上で重要な示唆をいただきました。また、知財戦略に関する助言や多方面からのサポートを通じて、研究の基礎固めに大きく貢献してくださいました。

光加工・プロセス分野の沖原伸一朗准教授（副指導教員）には、研究の開始当初から論文執筆に至るまで継続的に丁寧なご指導を頂戴しました。実験計画の立案や結果の解釈における助言のみならず、計測装置の管理や借用における手続き、さらに大学事務局との連絡調整等にも多大なご尽力を賜り、研究を円滑に進めることができました。

次に、バイオフィotonicsデザイン分野の水野誠一郎特任教授には、装置試作の段階でセンサー素子のマイコン駆動や信号取得に関する具体的な技術指導を頂きました。これらのご助言によって、測定精度の向上とトラブルシュートを迅速に行うことができました。

先端光産業経営分野の姜理恵准教授には、社会科学的視点を踏まえた論文の内容の深化について多角的なご指導をいただきました。事業実践の観点からの助言を盛り込むことで、研究の応用可能性をより明確に示すことができました。

帝京大学医学部微生物学講座の吉野友祐教授には、研究の中核をなす微生物の取り扱いや細菌株の提供など専門的なご支援を賜りました。加えて、同講座の畑山奈美様には、細菌の凍結保存から培養に至る基礎技術を丁寧にご教示いただきました。微生物学分野における諸氏の協力がなければ、本研究は成立し得なかったと感じております。

また、本学前学長であり、株式会社TAKシステムイニシアティブ代表取締役の瀧口義浩先生には、分光器や光電子増倍管に関する基礎的知識から実装まで幅広くご助言いただくとともに、装置貸与を含む多岐にわたる支援を賜りました。様々な起業家プログラムの情報提供なども含め、臨床家および研究者としての将来像を考える上で、大いに参考となりました。

本学伊藤博康学長には、有機物測定、とりわけラマン散乱光の分析に関する専門的知識をご教示いただきました。また、医療分野におけるバイオフィotonicsデザインの重要性を再認識するうえで大きな示唆を得ることができ、厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院医学系研究科 形成外科学分野の栗田昌和先生には、研究体制の構築・保守管理や実験結果の解釈にとどまらず、研究者としての基本的な姿勢から論文執筆にいたるまで多面的なご指導を賜りました。医学系研究者としてのロールモデルを示していただきました。

これら諸先生方のご指導とご支援がなければ、本研究を完遂することは困難であったと痛感しております。改めて深く感謝申し上げます。

あわせて、共同研究者、学友の皆様にも、日々の議論や示唆を通じて多大なる支えをいただきました。新たな視点やアイデアは、こうした議論の中で得られることが多く、大きな励みとなりました。

さらに、本学事務局の方々には、助成金申請や各種手続き、研究環境の整備にご尽力いただき、研究に集中できる体制を整えてくださいました。ここに重ねて感謝の意を表します。

最後に、本学とのご縁を結んでくださり、進捗管理や院生生活に対して多方面から気を配ってくださった浜松医科大学 形成外科学講座の中川雅裕教授に、深く御礼申し上げます。

以上の皆様のご協力なくしては、本論文を完成させることはできませんでした。ここに改めて厚く御礼を申し上げ、本稿の謝辞とさせていただきます。

8. 補遺

8.1. データセット

Daisuke, M. (2024). Excitation Emission Matrix of Bacteria [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14308976>

8.2. コード

<https://github.com/mitoudaisuke/GPI>

8.3. 使用部品一覧

8.3.1. LED光源の検討時のシミュレーションに使用したLED (4.1.参照)

- [1] LN-SMD4040UVC-P1 (LEARNEW OPTO、中国)
- [2] TH-UV235T1WPS100-3535G (Tianhui、中国)
- [3] IN-C35PPCTGU0 (inolux、米国)
- [4] TH-UV255T1WPS40-3535F (Tianhui、中国)
- [5] LN-SMD3535UVC-P1 (LEARNEW OPTO、中国)
- [6] TH-UV265T1WPS40-3535F (Tianhui、中国)
- [7] ZEUBE265-2CA-TR (Stanley Electric Co.、日本)
- [8] TH-UV275T1WPS40-3535F (Tianhui、中国)
- [9] SU CULEP1.VC-MHMM-57-1-350-R18 (ams-OSRAM、オーストリア／ドイツ)
- [10] IN-C45PPCTGU1 (inolux、米国)
- [11] VLMU35CB20-275-120 (Vishay、米国)
- [12] XBT-3535-UV-A130-CD270-00 (Luminus Devices、米国)
- [13] MTSM310UV-F1120S (Marktech Optoelectronics、米国)
- [14] LN-SMD3535UVC-P1 (LEARNEW OPTO、中国)
- [15] TH-UV325T1WPS40-3535F (Tianhui、中国)
- [16] TH-UV335T1WPS40-3535F (Tianhui、中国)
- [17] MTSM340UV2-F5120S (Marktech Optoelectronics、米国)
- [18] VLMU3511-365-130 (Vishay、米国)
- [19] BWL-35P1U44-45R (American Bright Optoelectronics Corporation、米国)
- [20] LHUV-0385-A070 (Lumileds、オランダ)
- [21] CUN86A1G (SETi／Seoul Viosys、韓国)
- [22] NDU1104ESE-385-TR (Stanley Electric Co.、日本)
- [23] LHUV-0395-A070 (Lumileds、オランダ)
- [24] ATDS3534UV395B (Kingbright、台湾)
- [25] LHUV-0405-A070 (Lumileds、オランダ)
- [26] QLUV04H3U-400 nm (Quelighting Corp、中国)
- [27] LHUV-0415-A070 (Lumileds、オランダ)
- [28] QLUV04H3U-420 nm (Quelighting Corp、中国)
- [29] LTPL-C034UVH430 (Lite-On、台湾)

8.3.2. 単一LEDによる試作に使用した部品 (4.2.1.参照)

LED : VLMU3511-365-130 (Vishay、米国)

SMD LED用アルミ基板 : BER272-ND (Bergquist、米国)

LED用ヒートシンク：ATSEU-077B-C6-R0 STAR HEAT SINK LED（Advanced Thermal Solutions、米国）

安定化電源：DPS3010U（wanptek Central、中国）

非球面コンデンサーレンズ：ASL1210-UV（Thorlabs、米国）

石英セル（四面透明）：309-15-03-26（東京硝子器械、日本）

ロングパスフィルター：FELH0450（Thorlabs、米国）

分光計：CCS200/M（Thorlabs、米国）

光ファイバー：M93L01（Thorlabs、米国）

8.3.3. 複数LEDによる試作に使用した部品（4.2.3.参照）

LED：IN-C35PPCTGU0（inolux、米国）、IN-C45PPCTGU1（inolux、米国）、VLMU3511-365-130（Vishay、米国）、NDU1104ESE-385-TR（Stanley Electric、日本）

SMD LED用アルミ基板：BER272-ND（Bergquist、米国）

LED用ヒートシンク：ATSEU-077B-C6-R0 STAR HEAT SINK（Advanced Thermal Solutions、米国）

安定化電源：DPS3010U（wanptek Central、中国）

非球面コンデンサーレンズ：ASL1210-UV（Thorlabs、米国）

石英セル（四面透明）：309-15-03-26（東京硝子器械、日本）

ロングパスフィルター：#34-299（Edmund Optics、米国）、FELH0400（Thorlabs、米国）FELH0450（Thorlabs、米国）

分光計：CCS200/M（Thorlabs、米国）

光ファイバー：M93L01（Thorlabs、米国）

8.3.4. 分光計の試作、評価に使用した部品（4.3.2.参照）

アクロマートダブリットレンズ：AC127-025-A（Thorlabs、米国）、AC254-050-A（Thorlabs、米国）

光学スリット：S50K（Thorlabs、米国）

回折格子：GR25-0605（Thorlabs、米国）

イメージングレンズ：MVL50M23（Thorlabs、米国）

2次元CMOSセンサー：IMX291（Shenzhen Ailipu Technology、中国）

光ファイバー：M93L01（Thorlabs、米国）

ネオンランプ：655-9413（アールエスコンポーネンツ、日本）

8.3.5. 微弱光用の分光計の試作に使用した部品（4.3.4.参照）

ミラー：BB1-E02（Thorlabs、米国）

レーザーモジュール：M532-5-ND（US-Lasers、米国）

レーザーハウジング：LHHS#2（Wuhan RLTC Technology、中国）

安定化電源：DPS3010U（wanptek Central、中国）

顕微鏡用対物レンズ：RMS20X（オリンパス、日本）

アクロマートダブリットレンズ：AC127-025-A（Thorlabs、米国）、AC254-050-A（Thorlabs、米国）

ロングパスダイクロイックミラー：DMLP550（Thorlabs、米国）

ロングパスフィルター：FELH0550（Thorlabs、米国）

光学スリット：S50K（Thorlabs、米国）

回折格子：GR25-0605（Thorlabs、米国）

イメージングレンズ：MVL50M23（Thorlabs、米国）

2次元CMOSセンサー：IMX291（Shenzhen Ailipu Technology、中国）

光ファイバー：M93L01（Thorlabs、米国）

ネオンランプ：655-9413（アールエスコンポーネンツ、日本）

8.3.6. センサーの試作、評価に使用した部品（4.3.6.参照）

リニアCCDセンサー：TCD1304（東芝、日本）

ヘックスインバータ：TC4069UBP（東芝、日本）

マイクロコントローラー：STM32F103c8t6（STMicroelectronics、スイス）

オシロスコープ：PicoScope 2406B（Pico Technology、イギリス）

8.4. 事業実践記録

表8-1 事業実践記録

実施年月日	内容	実施場所
2022.9 - 12	始動2024（国内プログラム）： 毎月隔週土日で講義とグループワーク、メンタリング、ピッチ大会等を実施	CIC Tokyo（東京）、 オンライン
2022.12 - 2024.11	MEDISO：法規面についての支援面談、戦略面談を実施	オンライン
2023.2	始動2024（国外プログラム）： 企業/アクセラレーション施設/インキュベーション施設訪問、 メンタリング、ピッチ大会等を実施	シリコンバレー（米国）
2023.3 - 2025.1	弁理士と知財戦略について対面/オンラインでの面談を実施	オンライン
2024.2 - 2024.4	JETRO：国外販売における法規と実務についての支援面談を実施	JETRO東京（東京）、 オンライン
2024.2 - 3	東京都認定特定創業支援：創業支援面談を実施	港区立産業振興センター（東京）
2024.8 - 10	JETRO（国外出展支援）： 展示会出展、企業訪問、メンタリング等を実施	ベルリン/イエーナ（ドイツ）、 オンライン
2024.9 - 2025.1	国内協業医療機器製造/製販企業：ピッチ、面談、戦略相談を実施	各企業社屋（東京）
2024.9 - 2025.1	国外協業企業：面談、戦略相談を実施	企業社屋、オンライン
2024.10-2025.1	薬事コンサルタント：法規についての面談、戦略相談を実施	企業社屋（東京）