

# 病理標本の膜厚測定機器開発： 膜厚標準化による標的分子評価と 人工知能体系の適正化に関する研究

増田しのぶ<sup>1)</sup>, 中西陽子<sup>1)</sup>, 廣谷ゆかり<sup>1)</sup>, 菊池加穂里<sup>1)</sup>, 阿部 仁<sup>2)</sup>,  
向井規浩<sup>3)</sup>, 西川喜久<sup>3)</sup>

## A study of development of a device to evaluate the tissue thickness of pathological sections: For adequate evaluation of biomarkers and basic platform for artificial intelligence systems by standardization of tissue thickness

Shinobu MASUDA<sup>1)</sup>, Yoko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Yukari HIROTANI<sup>1)</sup>, Kaori KIKUCHI<sup>1)</sup>,  
Hitoshi ABE<sup>2)</sup>, Norihiro MUKAI<sup>3)</sup>, Yoshihisa NISHIKAWA<sup>3)</sup>

### 要旨

昨年度、病理標本の膜厚測定機器プロトタイプ1号機を開発した。動作確認、精度評価に基づき、改良型プロトタイプ2号機を開発し、1号機との測定精度の比較検討を行った。2号機は1号機よりも測定精度の格段の向上が認められたものの、目標とする社会実装可能に必要な測定精度に至らなかった。そこで、理工学的視点からの要素検討、測定原理そのものの見直しをはかった。「曲げ応力計測」の原理に基づく測定方法の有効性について予備的検討を行い、その有効性を検証した。

### 1. はじめに

病理診断は、身体から採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片（formalin fixed paraffin embedded sections, FFPE）を用いて行われる。乳癌診療においては、バイオマーカーであるホルモン受容体（エストロゲン受容体, ER; プロゲステロン受容体, PgR）、HER2の発現状況と増殖活性マーカーである Ki67陽性率によって、薬物療法の治療選択が行われる。すなわち、ER陽性症例には抗ホルモン薬が、HER2蛋白高発現あるいはHER2遺伝子増幅を伴う症例には抗HER2抗体療法が、また、いずれも陰性の症例には、抗がん剤の適応となる。HER2蛋白に対する免疫染色結果により抗HER2抗体療法の適応が決定されるため、その精度管理が重要である。

通常、FFPE切片は予め厚み（以下 膜厚）を設定してミクロトームを用いて薄切される。しかしながら、FFPEの膜厚は、薄切環境（湿度や温度）や薄切技術により変化し、ミクロトームで設定した膜厚と実際に薄切されたFFPEの膜厚が必ずしも一致しない。われわれは先行研究において、FFPEの膜厚がHER2蛋白に対する免疫染色のスコア評価に影響を与えることを、染色強度の画像解析手法により証明した<sup>1)</sup>。FFPEの膜厚は、その後の免疫組織学的検討の基礎となるにもかかわらず、現在まで十分な精度管理の対象となってきたおらず、膜厚コントロールシステムの確立が喫緊の課題であるとの認識に至った。膜厚コントロール方法について、特許出願（:PCT/JP2018/017336）しているが、直接的に膜厚を測定する機器開発を目指して、本研究を行った。

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) がん研有明病院臨床病理センター

3) (株) 西川精機製作所

責任者連絡先: 増田しのぶ, masuda.shinobu@nihon-u.ac.jp

## 2. 対象及び方法

### (1) 本研究による開発機器のコンセプト

現在、膜厚測定用の先行機器は存在しない。本研究による開発機器のコンセプトは、工業用の非接触表面・層断面形状計測システム（光干渉方式初高精度表面形状計測）に比較して、測定範囲、使用目的を限定し、手頃な価格を目指すこととした（表1）。

### (2) 2号機の開発

当初の研究計画では、スライドガラス載置トレイを移動させ、10枚の連続測定を行う計画であった。しかしながら、昨年開発した1号機では期待した測

定精度を得ることができなかったため、表2に示すようなハード面、ソフト面の仕様変更を行い、2号機を開発した（表2、図1）。

### (3) 測定精度の評価（1号機と2号機の比較）

薄切時にミクロトームの設定を4 $\mu$ mとし、あらかじめ工業用測定システムにより膜厚を測定したFFPE標本10枚について、開発機器（1号機、2号機）により膜厚を測定した結果を比較検討した。検体間のばらつき、ならびに1枚の切片の4ヵ所の測定部位によるばらつきについても、比較検討した。

表1 工業用測定システムとの対比による本研究開発機器のコンセプト

|         | 工業用測定システム        | 本研究開発機器                        |
|---------|------------------|--------------------------------|
| 測定範囲    | ~ 80 $\mu$ m     | 4 $\mu$ m $\pm$ 10% 誤差を中心とする範囲 |
| 機器の使用目的 | 工業製品に対して汎用的使用を想定 | 膜厚測定に限定                        |
| 価格      | 高価               | 市中病院で購入可能な価格帯                  |

表2 膜厚測定器 1号機、2号機 仕様変更対比表

(株) 西川精機製作所

#### 1. ハードの変更

| No. 変更項目      | 第一期            | 第二期               |
|---------------|----------------|-------------------|
| 1 ボールネジ使用部分変更 | Z軸部のみボールネジを使用  | XYZ（3軸）にボールネジを使用  |
| 2 ワークステージの変更  | 「樹脂製の固定具無し」の設定 | アルミ製+固定クリップの設置    |
| 3 根幹となる、基本設計  | 10枚連続で測定する     | 測定数量を、1枚にして精度を上げる |

#### 2. ソフトの変更

| No. 変更項目            | 第一期        | 第二期                 |
|---------------------|------------|---------------------|
| 1 日時の設定方法           | 特定コマンドより設定 | ユーザーに分かり安いプログラム起動設定 |
| 2 PCと本機（マイコン）との通信方法 | 無線接続       | 有線接続                |
| 3 測定資料数量の変更         | 10枚連続で測定する | 測定数量を、1枚にして精度を上げる   |



図1 1号機、2号機の仕様の変更

### 3. 結果

#### 機器の動作確認 (2号機)

①測定部, ②標本識別部, ③PC制御, ④データ管理部それぞれについて, 動作確認を行い, 設計通りに動作することが確認された。

#### (2) 1号機と2号機の測定結果の比較

- 概要 (図2) :1号機の測定結果 ( $22.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ) に比較して, 2号機では格段の測定精度の向上が認められた ( $8.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$ )。
- 検体毎の測定値 (図3) :1号機に比較して, 2号機では測定精度の向上が認められたが, 依然, 測定値のばらつきも大きかった。

- 定部位による測定値 (図4) :スライド切片上の4ヵ所の測定部位によるばらつきが解消された。

2号機においては, 1号機よりも測定精度の格段の向上が認められたものの, 社会実装可能な機器に求められる測定精度に至らなかった。

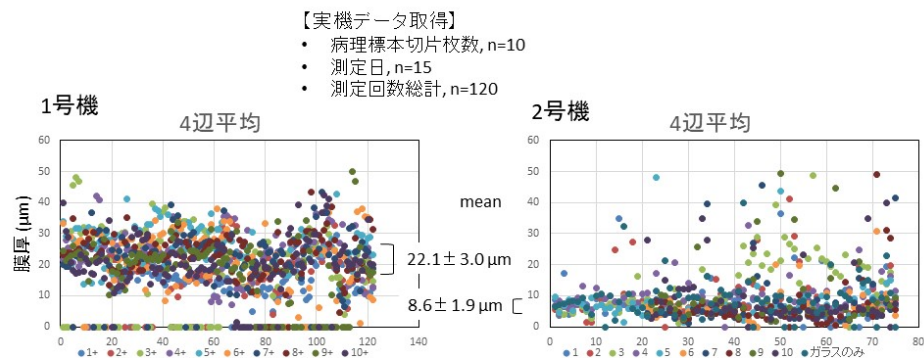


図2 1号機, 2号機の測定結果 (分布)

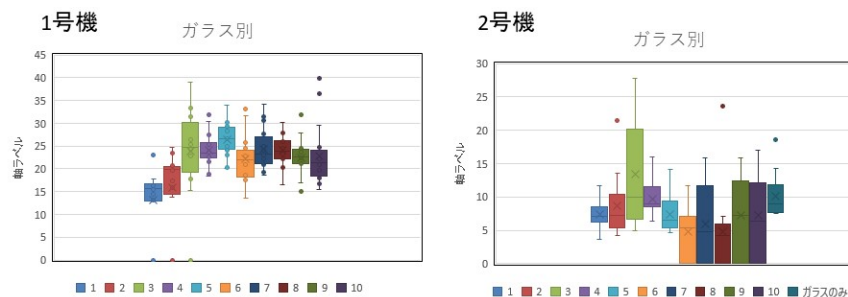


図3 1号機, 2号機の測定結果 (ガラス別)

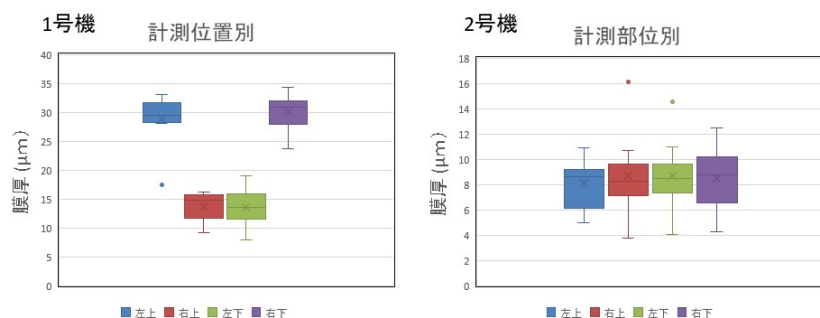


図4 1号機, 2号機の測定結果 (測定部位別)

#### 4. 考察

2号機の測定結果 ( $8.6 \pm 1.9\mu\text{m}$ ) は、目標とする測定精度 ( $4.0 \pm 10\%\mu\text{m}$ ) に達しなかった。理工学部 青木義男教授、入江寿弘教授、大塚賢哉助手との共同で、理工学的視点からの要素検討を行い、以下の点が課題として指摘された。

- ・測定対象の試料はパラフィンであり、物理的な接触による膜厚測定では接触力で変形する。
- ・高さ測定用プローブが複数ある場合、プローブ間の高さ方向の誤差および測定対象のガラスブ

レートの傾斜により、測定部位により誤差が大きくなる。

測定原理そのものを見直すこととなり、「曲げ応力計測」の原理に基づく、ひずみゲージを用いた機器開発の可能性について、検討することとなった(図5)。

「曲げ応力計測」(2ゲージ法)の原理を図6に示す。ひずみは構造敏感な物理量で、触針から固定部までの距離(X)をとることで測定感度を向上することが可能である。

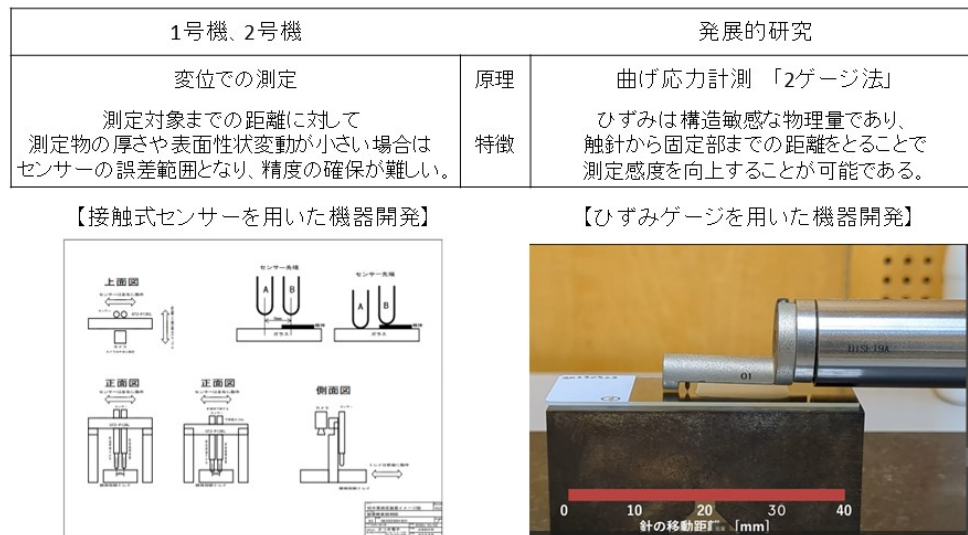
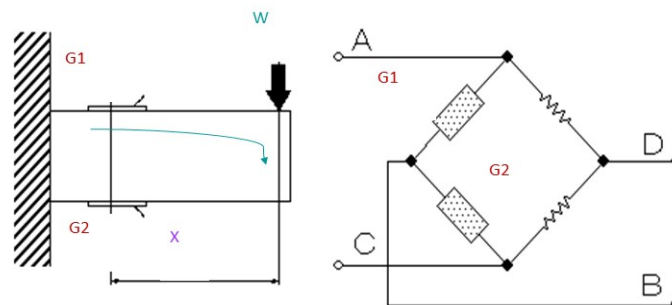


図5 理工学部との共同研究により方法論・原理の見直し



- ・取り扱いが簡便で安価な膜厚測定手法として、検出器に「ひずみゲージ」を用いる。
- ・曲げ応力計測として用いられる、2ゲージ法(G1, G2)を応用し、ガラスと病理組織切片との差を測定し、膜の厚さを測定する。
- ・ひずみは構造敏感な物理量であり、触針から固定部までの距離(X)をとることで測定感度を向上することが可能である。

図6 曲げ応力計測2ゲージ法の原理

市販の表面粗さ測定機を用いた予備的検討によりガラス面と切片表面の高さの差異について、 $4.5\mu\text{m}$ 程度の測定結果を得ることができた(図7)。

以上の結果から、実用化のためには、「曲げ応力計測」原理に基づく、より多角的で深度のあるプロジェクトが必要となった。

## 5. 結語

病理標本の膜厚測定機器としてプロトタイプ1号機、2号機を開発した。目標とする社会実装に必要な測定精度には至らなかったものの、医学と理工学の複合的視点から有意義な議論と検証がなされ、今後の方向性が示された。

## 謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金(社会実装研究)の助成をうけて行いました。理工学的視点から、貴重な意見をいただき、探索検証を行っていただきました理工学部 青木義男教授、入江寿弘教授、大塚賢哉助手に深謝いたします。

## 文献

- 1) Masuda, S., Suzuki, R., Kitano, Y., et al. Tissue Thickness Interferes With the Estimation of the Immunohistochemical Intensity: Introduction of a Control System for Managing Tissue Thickness. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021; 29: 118-126

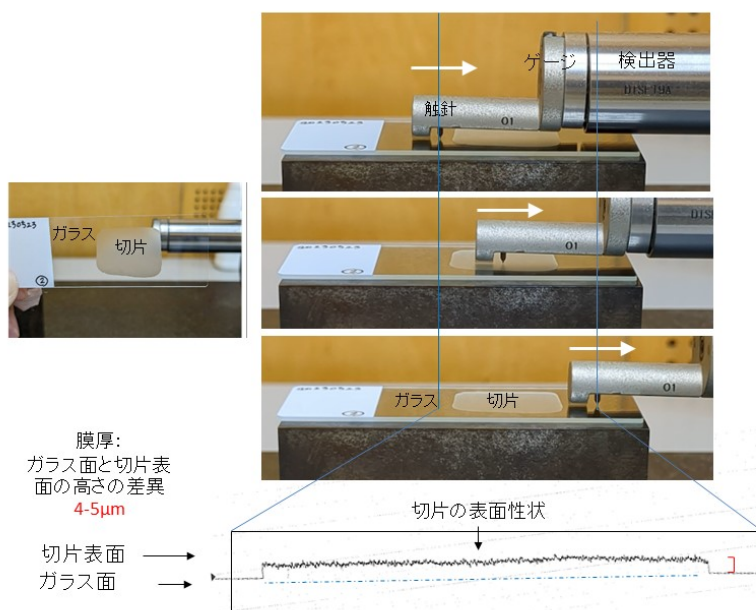


図7 市販の表面粗さ測定器を用いた予備的検討