

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 三次元像フローサイトメーター基盤技術の開発  
(英語) Development of base technology for 3D imaging flow cytometer

研究開発実施期間：2016年8月25日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 山田秀直  
(英語) Hidenao Yamada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 浜松ホトニクス株式会社・中央研究所第7研究室・主任部員  
(英語) Hamamatsu Photonics K.K. Central Research Laboratory, Senior Researcher

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等  
(2016年度)

細胞を標識なしに撮影した二次元画像を解析することにより、白血球と培養がん細胞を識別する方法の評価方法を確立した。また、血液試料を対象にした自動セルカウンターを開発した。三次元像フローサイトメーター装置(3D撮影装置)の研究開発において、単位時間あたりに撮影できる細胞数を向上させる方法を考案し、それを実現する流路開発を主に行った。

がん患者の末梢血液中には、原発巣から流れ出たがん細胞が存在することがあり、血中循環腫瘍細胞(CTC)と呼ばれる。血中循環腫瘍細胞は、赤血球や白血球などの血球細胞と混在しており、白血球数との比は100万分の1から1000万分の1とされ、その検出は容易ではない。既存の血中循環腫瘍細胞の検出技術として、抗原抗体反応を用いて循環腫瘍細胞自体を認識して検知する方法が知られているが、細胞に一定のダメージが加わることや、抗体で認識できない血中循環腫瘍細胞を回収できないなどの問題がある。そこで、これまでに、非染色・非破壊で無色透明な細胞を可視化できる定量位相顕微鏡を用いて細胞を観察し、人工知能(AI)技術を用いて画像解析を行い、白血球とがん細胞を識別する技術の研究開発を行ってきた。今回は、この技術の評価方法の確立を行った。具体的には、健常人の白血球と、GFPを発現させた大腸癌細胞株HCT116とを任意の割合で混合し、血中循環腫瘍細胞モデルを作成した。これらの細胞の定量位相顕微鏡像と蛍光像を同時に撮影し、AIが正しく白血球のみを白血球として識別することを確認した。さらに、このAIを用いて、

担癌マウスや多発肺肝転移のある胃癌患者の末梢血液中の血中循環腫瘍細胞の検知に着手した。

血液にごくわずかに存在する血中循環腫瘍細胞を効率的に検知するためには、白血球や循環腫瘍細胞などの有核細胞以外は、前処理にて排除できることが好ましい。血液前処理方法の検討を行い、従来の Ficoll 法に比べてデブリの混入が 10 分の 1 に抑えられる HetaSep 法を選別した。この血液前処理方法の選別に際しては、研究開発した血球細胞とデブりを計数する自動セルカウンターを用いた。本自動セルカウンターを用いることで、初めて血球細胞の高精度の計測が可能となり、安定した定量的な評価方法の確立が達成できた。

また、カメラの撮影速度に依存して、単位時間あたりに撮影できる細胞数が制限される問題を克服する方法を考案した。それを実現する特殊な構造を有する流路を設計・作製し、一定の効果をえた。

#### (2017 年度)

本委託研究開発で試作する三次元(3D)像フローサイトメーター(3D 撮影装置)の基礎となる二次元像フローサイトメーター(2D 撮影装置)にて擬似 CTC 試料を測定し感度 80%を得た。また、同じく擬似 CTC 試料を 3 次元像測定し、二次元像による測定方法と比較して識別能が高いことを示した。一方、血液前処理法の選定を目的として、2016 年度に既存の Ficoll 法と血液分離キット HetaSep (STEMCELL Technologies) を用いた遠心分離法(HetaSep 法)を比較検討したが、2017 年度は塩化アンモニウムを用いた遠心分離法(新法)の有用性を検討した。その結果、デブリ混入率の低さおよび白血球分画比率ともに新法が優れており、最適な血液前処理法であると評価した。

3D 撮影装置の研究開発においては、高スループット化のための流路開発、高空間分解能化および高屈折率分解能化のための光学系開発を進めた。またカメラからの画像データを高速にフーリエ変換する中間演算処理システム開発も進めた。さらにはこれらの要素技術の組み立ても進めた。3D 撮影装置の光学的評価のために、細胞を模擬した試料を作成し光学分解能評価用試料を準備した。

さらには 3D 撮影装置の臨床的評価として、新法で血液前処理を行い得られた以下に示す試料を用いて、2D 撮影装置で定量位相像と蛍光画像の同時撮影を行い、3D 撮影装置の臨床的評価を行った。

- ・ 健康人やヌードマウスの血液を前処理した試料と GFP 発現培養癌細胞を混合した擬似 CTC モデル
- ・ GFP 発現培養癌細胞のマウス移植モデルの血液を前処理した試料

上記における GFP 発現培養癌細胞が、定量位相像によって正しく非白血球と判定されるか検討した。この判定を正しく行うためには、定量位相像の正確な識別能、僅かな発光をも検知可能な蛍光顕微鏡の検知能の向上、さらに同時撮影で得られる 2 つの画像を各細胞で完全に一致対応させる必要性が判明した。

一方で、食道癌や胃癌患者の血液を前処理した試料を 2D 撮影装置で撮影し、多数のデータを集積した。得られた撮影データを識別器にかけることで、各細胞が白血球または CTC 候補のいずれかに分類されるが、事前に識別器に学習させる訓練画像によって識別結果が異なることが判明し、最適な識別器のための訓練画像に関する比較検討を行った。

2017 年度は三次元像フローサイトメーターの開発の基礎となる 2D 撮影装置を用いた臨床検体の観察データを蓄積することができた。

#### (2018 年度)

細胞内の屈折率分布を三次元(3D)像撮影できる 3D 撮影装置の高スループット、高分解能、高屈折率分解能を目指した要素技術の研究開発を 2017 年度までに行った。2018 年度は、これらの要素技術を組み合わせ、3D 撮影装置の「干渉光学システム」を完成させた。さらに、高速カメラからの画像を収集・演算処理する「画像収集・中間演算処理システム」と「画像再構成計算・表示システム」とを組み合わせ、3D 撮影装置を完成させた。

次に、撮像装置の光学的評価を行った。2018 年度に選定・作製したマイクロビーズを細胞に見立てた擬似

サンプルとして、撮像装置の空間分解能、屈折率分解能を測定した。光軸調整や試料位置、角度の調整を繰り返すことで、最終的に空間分解能は  $0.3\ \mu\text{m}$  以下、屈折率分解能も 0.01 以下となった。

血液前処理に関しては、2017 年度に最適な手法として選別した塩化アンモニウム法の手技を定型化し、採血後の試料中における細胞形態が撮影時間内で維持されていることを確認した。

3D 撮影装置の臨床的評価に関しては、二次元像撮影装置（2D 撮影装置）を用いて消化器癌患者の血液試料の撮影データを集積し、臨床情報と比較検討した。術前化学療法（NAC）が奏効後に根治手術を行った StageII 食道癌では、NAC 後に CTC 率が  $4.5 \rightarrow 0.3\%$  と低下し、手術後に  $0.2\%$  へ低下した。一方、NAC 非奏効後に根治手術を行った StageIII 食道癌では、NAC 後に CTC 率が  $2.2 \rightarrow 13.6\%$  と上昇し、手術後に  $1.9\%$  に低下しており、臨床経過との一致を認めた。

また、健常人白血球と GFP 発現培養癌細胞を混合した疑似 CTC モデルを用いて、蛍光同時撮影により同定した GFP 発現培養癌細胞が、2D 撮影装置によって 80% 以上の正答率で非白血球と判定される事を確認した。

2018 年度は 3D 撮影装置を試作し、健常人白血球 20,000 個と培養癌細胞 10 個を混ぜた疑似 CTC モデルを測定し精度を確認した。GFP 発現培養癌細胞を皮下注したマウス 10 匹より得た血液試料を 3D 試作機で測定し、CTC 候補細胞を検知した。また、NAC 前後、手術前後、再発治療中の食道癌患者 10 例の血液試料を 3D 撮影装置で測定した。一方、3D 撮影装置は連続撮影時間に制限があるため、2D 撮影装置による一次検査と 3D 撮影装置による二次検査を融合したハイブリッド法を考案した。

In this project, we have conducted research and development of elemental technology aimed at high throughput, high resolution, and high refractive index resolution of three-dimensional (3D) imaging equipment that can capture 3D images of the refractive index distribution in cells. These elemental technologies were combined to complete the “interference optical system” for 3D imaging equipment. Furthermore, the 3D imaging device was completed by combining an “image acquisition / intermediate processing system” and an “image reconstruction calculation / display system” that collect and process images from high-speed cameras. Next, optical evaluation of the imaging device was performed. We measured the spatial resolution and refractive index resolution of the imaging device as a pseudo sample based on the microbeads selected and fabricated. By repeating the adjustment of the optical axis and the adjustment of the sample position and angle, the spatial resolution finally became 0.3  $\mu\text{m}$  or less and the refractive index resolution also became 0.01 or less.

Regarding pretreatment of blood samples, the procedure of the ammonium chloride method, which was identified as the optimal method, was standardized, and it was confirmed that the cell morphology in the sample after blood collection was maintained during the imaging time.

For the clinical evaluation of 3D imaging devices, we collected data of blood samples from patients with gastrointestinal cancer using a 2D imaging device and compared them with their clinical information. In patients with cStage II esophageal cancer who underwent radical surgery after successful neoadjuvant chemotherapy (NAC), the CTC rate decreased from 4.5 to 0.3% after NAC, and further decreased to 0.2% after surgery. In contrast, in patients with cStage III esophageal cancer who did not respond to NAC, the CTC rate increased from 2.2 to 13.6% after NAC, and decreased to 1.9% after surgery, consistent with the clinical course. In a pseudo CTC model composed of healthy human leukocytes and GFP-expressing cancer cell-lines, cancer cells identified by simultaneous fluorescence imaging were determined as non-leukocytes by 2D imaging device with a correct answer rate of 80% or more.

We prototyped a 3D imaging device, and measured the accuracy using a pseudo CTC model that mixed 20,000 healthy white blood cells and 10 cancer cell-line cells. Blood samples obtained from 10 mice, in which cultured GFP-expressing cancer cells were subcutaneously injected, were measured using a 3D imaging device, and CTC candidate cells were detected. In addition, blood samples were collected from 10 esophageal cancer patients who underwent surgery after NAC or received chemotherapy for recurrent diseases and were measured using a 3D imaging device. Finally, we have devised a novel hybrid method combining 2D and 3D imaging devices for the primary and secondary inspections, respectively, to overcome the limitation of current 3D imaging devices in continuous imaging time.