

日本医療研究開発機構 医療機器等における先進的研究開発・開発体制強靱化事業 事後評価報告書



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トリー細胞診による血中循環腫瘍細胞の質的診断法の開発
(英語) Qualitative diagnosis of circulating tumor cells using 3-dimensional image flow-cytometry

研究開発実施期間: 令和元年10月2日～令和4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) Senior Researcher, Central research laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.

II 研究開発の概要

近年のがん診療において治療の個別化が進みつつあるが、治療開始前の生検検体や手術検体の biomarker に基づくことが多く、がんの不均一性が問題となることがある。例えば生検による組織診断では、不均一な癌組織の全体像を捉えることが容易ではない。また、原発巣の切除検体を用いて転移巣に対する治療効果予測を行う場合、原発巣と転移巣の生物学的性質が必ずしも同一ではない点が問題となる。多発転移例では転移巣間での不均一性もあり、仮に一部の転移巣の詳細な解析を行ったとしても病変全体の治療効果を十分に予測し得ない。

そこで近年、新たな癌診断法として、生検や手術で得られる組織ではなく、血液検体を用いた液体生検 (liquid biopsy) の開発が急速に行われている。Liquid biopsy のうち CTC を用いる方法は癌細胞そのものの解析であり、癌の確定診断を行いやすいことに加え癌細胞 1 つ 1 つの質的診断が可能となるため、最も有用な手法として期待される。しかし、CTC は末梢血液中の有核細胞 $10^6 \sim 10^8$ 当たり 1 個の割合しか存在せず、その検出は困難であり、現在までに様々な手法が開発されてきた。これまで最も汎用されてきた Cell Search®をはじめとする多くの手法は、EpCAM など上皮細胞の表面マーカーを用いて CTC を同定している (positive selection)。一方、がんの転移における重要な細胞の形質変化である上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) によって生じたと考えられる間葉系細胞が CTC として存在することが示され、上皮細胞の表面マーカー依存的な従来の検出法では臨床で重要な CTC の取りこぼしがあること明らかとなった。このことが、従来の CTC 検出法が臨床で広く普及していない最大の原因であるとも言える。

そこで EMT を起こした細胞も含め CTC を漏れなく検出する方法として、血液中の有核細胞から白血球のみを除去する手法 (negative selection) を採用し、未知の CTC の取りこぼしを減らす試みが行われている。これによ

って、従来法では検出困難であった上皮マーカー陰性の CTC を含め複数種類の CTC を検出できるが、これまでに報告された negative selection 法のほとんどが CTC 候補細胞を標識またはサイズ等によって分取し診断しているため、循環腫瘍 DNA(ctDNA) など CTC 以外の liquid biopsy 法に比べ煩雑となり、広く臨床応用に至っていないのが現状である。

本課題では、三次元像フローサイトメトリーを開発し、細胞を分取しなくとも形態学的情報によって識別可能とする。これにより、より簡便に CTC の同定を行うことができるため、他の手法に比べ診断機器として広く普及し易い。また、3次元像を用いた細胞内部構造の詳細な解析により CTC の質的診断や細分類が実現できれば、臨床経過における CTC 分画の変化を経時的に捉えることが可能となり、再発の早期発見や治療効果の早期評価、さらに治療効果予測に基づいた治療個別化の実現に寄与する。

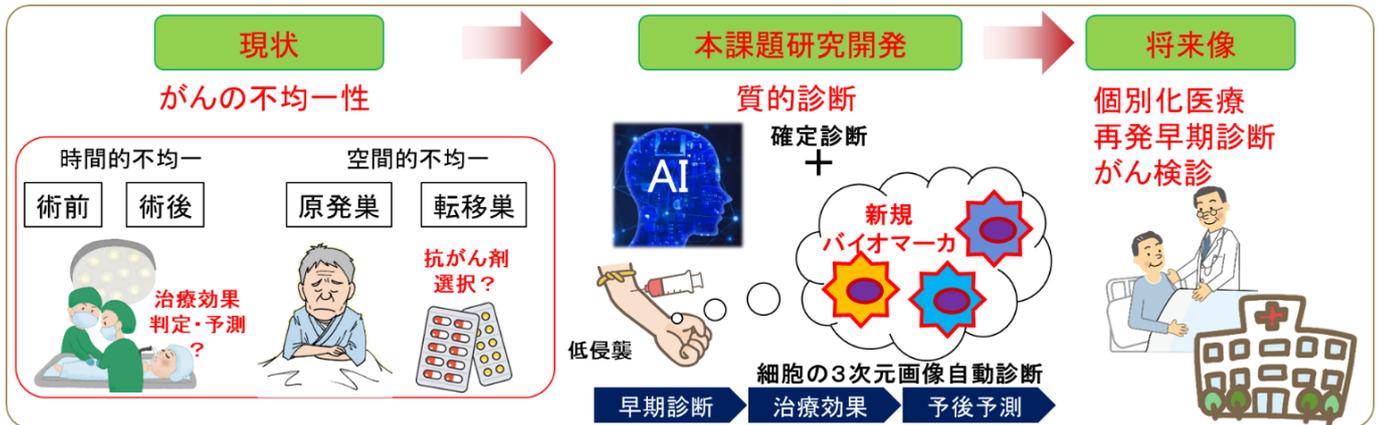


図1. 医学的問題点とその解決に向けた本研究開発、および得られる将来像。

【開発成果およびその意義】

本研究開発の開発物であるリアルタイム AI 駆動型 3 次元像フローサイトメーター（以後、試作機）では、奥行き方向の情報を含む定量位相像と呼ばれる 2 次元像を元に、リアルタイムで AI 判定し（スクリーニング検査）、目的細胞のみの 3 次元像を取得できる（精密検査）といった、市場には無いことはもちろんのこと、学術的にも類を見ない装置である。現在広く配布している従来型フローサイトメーターや、最新鋭の 2 次元像フローサイトメーターとは一線を画し、①エッジコンピューターによるリアルタイム AI、②光回折トモグラフィーによるラベルフリー 3 次元像の取得、③レディオミクス解析による 3 次元像 AI の最新鋭の技術を盛り込んだ試作機を開発した。

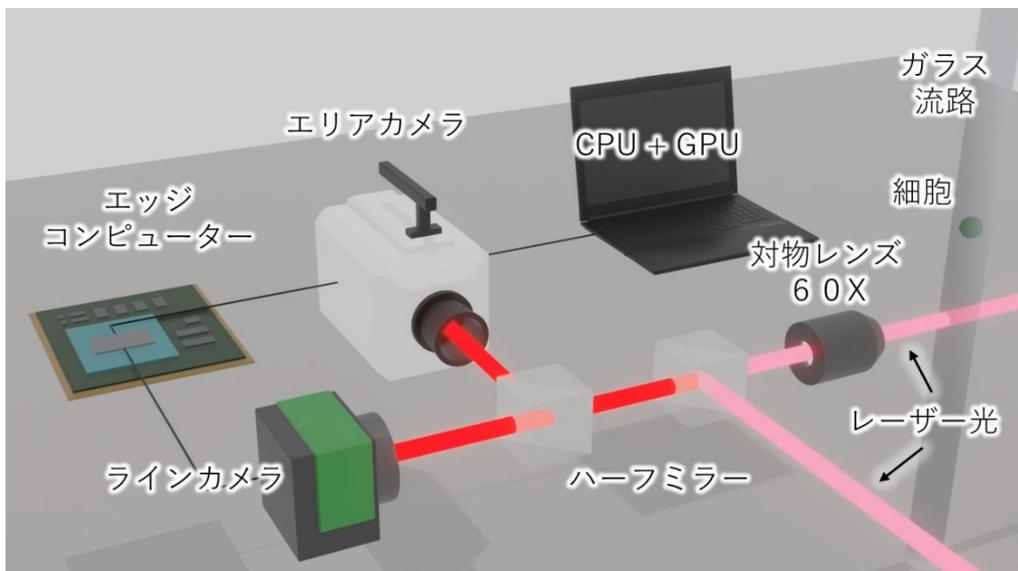


図2. 試作した AI 駆動型 3 次元像フローサイトメーター概略図

特にリアルタイム AI(①)を研究開発したことで、エリアカメラからコンピューターへの画像転送の帯域不足が解消できることを実験的に実証した。これにより、本研究開発のターゲットである CTC に代表される種々の希少細胞のラベルフリー3次元像の取得(②)を目的とした研究や診断機器の用途の道を広げた。

さらには、X線 CT など人体の解剖学的な情報が非侵襲的に得られる放射線画像の読影として注目を浴びているレディオミクス解析(③)を、細胞の解剖学的(形態学的)な情報が非侵襲的(非染色的)に得られる光回折トモグラフィーによる細胞の3次元像に応用し、画像の持つ臨床的な意味付けができることを実験的に実証した。これにより、細胞の形態情報(フェノタイプ)をバイオマーカーに、患者さんの病態や、さらには遺伝情報(ジェノタイプ)を推定する研究への道を広げた。

臨床検体を用いた観察では、2次元像に基づいた判定で非白血球(CTC 候補)細胞が健常人で年齢に関係なく一定数確認され、消化器癌患者さんでより多く認められることを確認した。さらに開発した試作機を用いて進行消化器癌患者さんの末梢血液を観察し、レディオミクス解析にて特徴的なクラスターが存在することを確認した。

技術的背景

現在、市場に広く流布しているフローサイトメーターは、1970年代に市場投入されてからその計測原理をほぼ変えていない。2022年6月に、海外大手フローサイトメーターから細胞分取機能付きの2次元像フローサイトメーター[1]の製品に関する報道[2]がなされた。一方、学术界からは、細胞は3次元構造を有していることから、2次元像から、ターゲットとするタンパク質や細胞内小器官等の3次元的位置を特定することは困難であることが指摘されている[3]。

1. D. Schraivogel, et al, "High-speed fluorescence image-enabled cell sorting," *Science* **375**(6578), 315–320 (2022).
2. "BD FACSDiscover™ S8 Cell Sorter," <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-sorters/bd-facsdiscover-s8>.
3. Y. Han, et al, "Cameraless high-throughput three-dimensional imaging flow cytometry," *Optica*, **OPTICA** **6**(10), 1297–1304 (2019).

英文

The real-time AI-driven three-dimensional image flow cytometer (hereinafter referred to as the prototype), which is the development of this research and development, makes real-time AI judgments based on a two-dimensional image called a quantitative phase image that contains information in the depth direction. It is an unprecedented device not only in the market but also academically, such as (screening test) and the ability to acquire a three-dimensional image of only the target cells (detailed test). It is different from the conventional flow cytometers that are widely used today and the latest two-dimensional image flow cytometers, (1) real-time AI by edge computer, (2) acquisition of label-free three-dimensional image by optical diffraction tomography, and (3). We have developed a prototype that incorporates the latest technology for 3D image AI by radiomics analysis.

In particular, by researching and developing real-time AI (1), we have experimentally demonstrated that the band shortage of image transfer from the area camera to the computer can be solved. This broadened the range of applications for research and diagnostic equipment aimed at acquiring label-free three-dimensional images (2) of various rare cells represented by CTC, which is the target of this research and development.

Furthermore, the radiomics analysis (3), which is attracting attention as an interpretation of radiographic images that can obtain non-invasive anatomical information of the human body such as X-ray CT, is an anatomical (morphological) cell. By applying the information to a three-dimensional image of cells obtained by non-invasive (non-staining) optical diffraction tomography, we experimentally demonstrated that the clinical meaning of the image can be achieved. This has opened the way to research to estimate the pathological condition of patients and even genetic information (genotype) using cell morphology information (phenotype) as a biomarker.

In the observation using clinical specimens, it was confirmed that a certain number of non-leukocyte (CTC candidate) cells were confirmed in healthy subjects regardless of age by judgment based on the two-dimensional image, and more were observed in gastrointestinal cancer patients. Furthermore, peripheral blood of patients with advanced gastrointestinal cancer was observed using the developed prototype, and it was confirmed by radiomics analysis that characteristic clusters existed.