

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology
Transfers: Development of Advanced Measurement and Analysis Systems

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

研究開発担当者 (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 山田 秀直
所属 役職 氏名： (英語) Hamamatsu Photonics K.K. Central Research Laboratory,
Senior Researcher, Hidenao Yamada

実施期間： 平成28年8月25日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 血液前処理評価システムの効率化, 血液前処理の効率化, 撮影装置の評価
開発課題名： (英語) Efficiency of the blood preprocessing and optical and clinical
evaluation of the imaging system

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 浜松医科大学 光先端医学教育研究センター
特任教授 岡崎 茂俊

所属 役職 氏名： (英語) Hamamatsu University School of Medicine, Preeminent Medical
Photonics Education & Research Center,
Professor Shigetoshi Okazaki

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

菊池寛利（浜松医科大学 医学部外科学第二講座 助教）、山田秀直 チームリーダー（浜松ホトニクス株式会社）のグループは、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。岡崎茂俊（浜松医科大学 光先端医学教育研究センター 特任教授）のグループは、血液試料を対象にした自動セルカウンターを開発した。山田グループは、三次元像フローサイトメーター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、菊池グループはこれまでに、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。菊池グループらは、血液前処理方法の検討を行い、従来のFicoll処理法に比べてデブリの混入が10分の1に抑えられる方法を選別した。この血液前処理方法の選別に際して、岡崎グループが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、山田グループは、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、一定の効果を得た。

英文

Hiroto Kikuchi and Hidenao Yamada's group established a label-free method to identify white blood cells and cultured cancer cells, by analyzing 2-dimensional images. Shigetoshi Okazaki's group developed an automatic cell counter for blood samples. In the process of developing a 3-dimensional flow cytometer, Yamada's group developed ideas to increase the number of cells captured per unit time, including the development of a flow channel.

In the peripheral blood of cancer patients, there is a possibility of presence of Circulating Tumor Cells (CTCs), cancer cells from the primary tumor. CTCs usually exists with other blood cells, such as erythrocyte and leukocytes in blood, and the number of CTCs is about one millionth to a tenth of a millionth to leukocytes, which makes it hard

to identify them. Although detecting CTCs with antigen-antibody reaction is generally known method, it causes certain damage to cells and is unable to retrieve CTCs unrecognized by antibody. Therefore, the groups like Kikuchi et al so far observed the cells using a quantitative phase microscope capable of visualizing transparent cells unstained and nondestructive, and distinguishing between the cancer cells and the white blood cells by the image analysis using the artificial intelligence (AI) technology. This time, we established the evaluation method of this technology. Specifically, leukocyte of healthy cells and colon cancer cell lines HCT 116 expressing GFP were mixed at an arbitrary ratio to prepare a pseudo CTCs model. Quantitative phase microscope images and fluorescence images of these cells were acquired simultaneously, and it was confirmed that AI identifies white blood cells correctly. Furthermore, using this AI, we started to detect CTCs in the blood of tumor-bearing mice and a gastric cancer patient with multiple metastases in the lung and the liver.

In order to detect a smidgen of CTCs in blood effectively, it is necessary to eliminate debris other than nucleated cells, such as CTCs and leukocytes, in preprocessing. Kikuchi's group has studied and selected a preprocessing method to separate blood into its components, which suppresses the ratio of debris to one tenth of the method using Ficoll-Paque®. For the selection of preprocessing method, we used the automatic cell counter, which can count blood cells and debris, developed by Okazaki's group. The automatic cell counter has made it possible to measure blood cells with a high degree of accuracy, and enabled to establish the stable and quantitative evaluation method.

In addition, Yamada's group devised a method to overcome the limitation of throughput of imaging cells due to the frame rate of the camera. The flow cell having a special structure was designed and produced, and a certain effect was obtained.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 0 件）

1. 山田秀直 「血中移動がん 立体撮影」（静岡新聞 2017 年 2 月 4 日）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし