

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2014

課題番号：25702024

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞を検出する超高速自動顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Ultrafast optical microscopy for detection of circulating tumor cells in blood

研究代表者

合田 圭介 (Goda, Kisuke)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70518696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲・迅速・低コストのガン検査に向けた超高速自動顕微鏡を開発した。この顕微鏡は、ヘテロな細胞集団をマイクロ流体デバイス内で細胞ひとつひとつを独自の超高速イメージング技術で撮影し、同時に蛍光測定を行うことで、リアルタイムで高精度に分析・分類する技術である。780 nmの空間分解能と70 Mfpsのフレームレートを達成した。このシステム上で、流速1 m/sで流れる10 μmのポリスチレンビーズの統計データを獲得した。この流速はスループットでは10,000 cells/sに相当する。本開発は内閣府革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)に吸収され継続中である。

研究成果の概要(英文)：We developed an ultrafast optical microscope for early, noninvasive, low-cost detection of cancer. This microscope is based on a combination of an ultrafast optical imager known as STEAM and a multi-color fluorescence analyzer for high-throughput screening of cells in a large heterogeneous population. Based on a Ti:Sapphire femtosecond pulse laser, we achieved high spatial resolution of 780 nm and high frame rate of 70 Mfps for high-speed morphological screening. Furthermore, we achieved focusing and ordering of cells in high-speed flow with high precision of a few micrometers. Using the developed system, we demonstrated single-cell analysis of a large population of cells with a high throughput of 10,000 cells/s. This work has been absorbed into the ImPACT program in which a far more advanced system is currently under development.

研究分野：光科学

キーワード：超高速イメージング ガン フローサイトメトリー 循環腫瘍細胞 高速顕微鏡 マイクロ流体工学

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の日本において、高額な医療費の圧迫が大きな問題となっている。高齢者最大の死因である抗がん治療やがん検診は、頻繁な検査と長期間に渡る評価 (MRIやCT、PETなど) が必要となるため、医療費の大きな割合を占めている。従来のイメージング技術は非侵襲的な癌の検出に対して一定の効果を上げているものの、医療費保険費の支出を抑え、癌患者 (とりわけ高齢者) のQOL (Quality of life) の向上するためには従来技術の延長を越えた新しい技術が求められている。

がん患者の9割が原発腫瘍ではなく、転移によって命を落としている。転移には多くの要因が絡んでいるが、血中を流れる循環がん細胞 (CTC) は以前から転移の主要原因として精力的に研究されてきた。しかし、CTCの存在量の低さから、これを正確に効率よく検出できる技術がなく、未だCTCを指標とした診断は多くない。

数少ないCTCを検出するためには大量の細胞を処理しなければならず、CCDカメラなどで正確に一つ一つ調べようとすると一人分の血液を調べるのに数週間から1ヶ月かかるため、現実的ではない。一方、高速に大量の細胞を調べようとすると、現在の技術ではシングルピクセル光検出器による一点の情報しか得られず、精度は非常に悪い。CCDカメラで撮ったような二次元空間情報を高速に取得する手法があれば、正確にかつ効率よくCTCを検出することが可能である。

2008年に合田らがタイムストレッチイメージングの技術を開発し、毎秒1千万から10億フレームの高速イメージング技術を開発した。この技術はシングルピクセルの光検出器が非常に高速に信号を取得できることを巧みに利用し、二次元空間情報をシングルピクセル光検出器で高速に取得する技術である。この技術を医療診断に応用することで、今まで利用できなかったCTCによるがん検出や他の血液を使った診断が可能となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、すでに原理実証されたタイムストレッチ顕微鏡を基に、パライメーシングに必要な不可欠な蛍光検出機能を付加し、画像と蛍光波長の両方を用いて観察対象を識別できることを証明した。また、より実践的な医療診断での応用を見据えた準備として、がん細胞の薬剤応答と臨床検体を用いた血小板凝縮を、初めてタイムストレッチ顕微鏡で観察した。タイムストレッチ顕微鏡を医療診断に応用するための重要な結果が多く得られたため、本報告書にまとめた。

3. 研究の方法

本研究での基礎技術となるタイムストレッチイメージングは、空間上の情報を光のスペクトル上に転写し、これを一次元的に引き延ばすことでシングルピクセルの光検出器で検出する技術である。実験装置の概略図を図1aに示す。

タイムストレッチイメージング技術は、広帯域パルスレーザー、空間分散器、時間分散器、光検出器、デジタイザー、そして信号プロセッサから構成される。レーザーから出た一つの光パルスは空間分散器で空間的に分散され、波長ごとに並んだ一次元の「虹」を作る。この「虹」が物体に当たることで、物体の空間情報が「虹」に記録されることになる。空間情報を携えた「虹」が時間分散器を通ると、空間情報が一次元の時間情報として読み取ることが可能となる。これをシングルピクセルの光検出器で検出し、デジタイザーによりコンピューターの取り込み、画像処理が行われる。一次元の空間情報を多数積み重ねることで二次元の画像が構築できる。タイムストレッチ顕微鏡の実際の写真を図1bに示す。

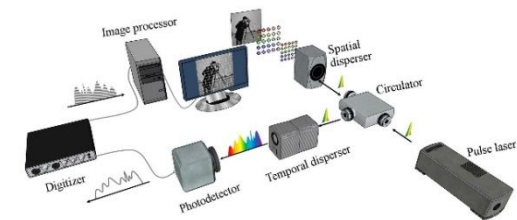
この原理は非常に高速に信号を取り込むことができるため、高速撮影技術として利用することが出来る。我々はこれをマイクロ流路デバイスと組み合わせることで、ハイスループットイメージサイトメトリーを構築した。マイクロ流路デバイス (図2) は高速で流れる物体を流路の中心に並べることができるため、タイムストレッチ顕微鏡と組み合わせることで、流れる細胞や粒子を高速で次々に撮影して検出・識別することが出来る。本

研究では流体の慣性力を利用し細胞を流路中央にフォーカスさせるマイクロ流路を応用した。(図2a、b、c)

光検出器で観測されたアナログデータはデジタイザーを通してデジタルデータに変換され、FPGA (field-programmable gate array) によって粒子の存在が確認された画像のみCPU (central processing unit) に送られ、画像処理される。CPUでは画像処理のみならず、認識や識別など様々な分析も行う。

我々の先行研究では、ヒト乳がん細胞であるMCF7を用いて、タイムストレッチ顕微鏡がハイスループットイメージサイトメトリーに適用できることが原理実証され、秒10万細胞の検出に成功した。しかし、画像だけでは細胞上の分子情報を直接取得することはできず、例えば先行研究では、1 μ mのビーズをがんマーカーであるEpCAMに付着させてこれを検出した。この方法は現在主流となっている蛍光による標識よりも利用できる幅が狭く、タイムストレッチ顕微鏡と蛍光検出の融合が長く待たれてきた。そこで、今回我々はタイムストレッチ顕微鏡に3色の蛍光を検出できる機能を付加し、これによって以前のスループットを落とさずに画像情報と蛍光情報の両方を同時に取得できるシステムを開発した。

(a)



(b)



図1: タイムストレッチ顕微鏡 (a) 概略図 (b) 実際の実験装置

4. 研究成果

我々のタイムストレッチイメージングに蛍光検出機能を付加することで、既存の生化学ツールを利用することができ、がん細胞検出の精度を向上することが可能である。我々は既に空間分解能780nm、ラインスキャンレート75Mfps、毎秒1万粒子のスループットを達成していたが、蛍光検出機能を付加しても、このスループットを保つことができる。

4-1. タイムストレッチ顕微鏡による粒子解析

タイムストレッチ顕微鏡の高い空間分解能のおかげで、統計的な外れ値を高い精度で検出し、さらに外れ値の原因を調べることが可能となった。図3ではマイクロ粒子の画像とその外れ値を示した。我々の定量分析の結果、このような外れ値は2つ以上の粒子凝集体であり、全体の3%を占めることがわかった。これらの凝集体は粒子製造の過程で作られたものかもしれないが、粒子分析において無視できない量である。粒子分析でよく使われるコールターカウンターでは、空間分解能を持たないため、このような外れ値は単純に直径の大きな粒子として認識される。このように外れ値の原因を突き止めることで、粒子製造プロセスの効率改善を図ることができる。また、イメージサイトメトリーに応用した場合、がん細胞の検出効率を向上することも可能となる。

我々はタイムストレッチ顕微鏡に蛍光検出機能を付加することで、同じような形をした粒子でも発する蛍光の波長が異なることを利用してこれらの粒子を識別することが可能となった。我々は3つの励起レーザー（488 nm、561 nm、638 nm）を組み込み、蛍光を出さない粒子を含めて合計で4種類の粒子を検出・識別することに成功した。図3bで示すように、4種類の粒子（Spherotech社製）はほぼ同様な形をしているため、タイムストレッチ顕微鏡の画像だけでは識別できない。しかしそれぞれの粒子はその化学的組成の違いから異なる波長の蛍光（526 nm、590 nm、690 nm）を発するため、蛍光信号からこれらの粒子を識別することが可能となった。

タイムストレッチ顕微鏡による粒子解析の優位性を示すために、標準的なコールターカウンター（Sysmex CDA-1000）と比較した。コールターカウンターから得られた粒子面積のヒストグラムを図4aに示した。全体的には平均面積が71.80 μm^2 で、標準偏差5.26 μm^2 （面積が50 μm^2 から110 μm^2 の間の粒子）がガウシアン分布となっているものの、110 μm^2 よりも大きいサイズの粒子も観測された。これら外れ値の粒子は全体からすれば無視できる量ではあるかもしれないが、重要な情報を持っている可能性がある。しかし、コールターカウンターの作動原理が一点観測であるため、このような外れ値の粒子がどのようなかを識別することはできない。一方、我々のタイムストレッチ顕微鏡では形態上の測定基準を設けることで外れ値の粒子を調べることも可能となる。図4bではタイムストレッチ顕微鏡によって観測された粒子面積のヒストグラムを示す。平均面積72.22 μm^2 、標準偏差11.21 μm^2 （面積が50 μm^2 から110 μm^2 の間の粒子）は共にコールターカウンターのものとは一致する。ピーク値が異なるのはコールターカウンターのインピーダンス計測がこの粒子に合わせて校正されていないためだと考えられる。分布の幅の違いはマイクロ流路中を流れる粒子がタイムストレッチ顕微鏡の焦点面から外れることがあるためだと考えられる。流速の不均一によって、粒子の画像が伸び縮みすることがあるが、画像処理の過程でこれを補正することが可能である。

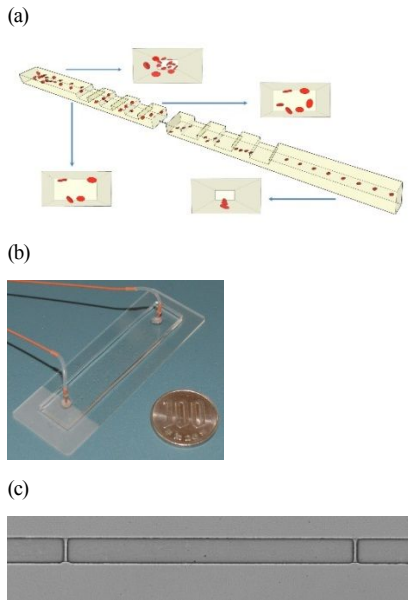


図 2: マイクロ流路デバイス (a) 概略図 (b) 装置実物 (c) マイクロ流路の拡大図

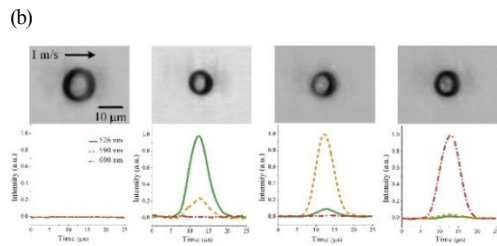
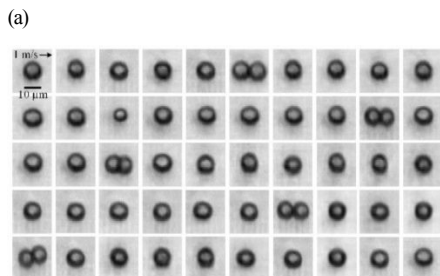


図 3: タイムストレッチイメージングによる粒子分析 (a) 粒子画像、(b) 画像と蛍光検出

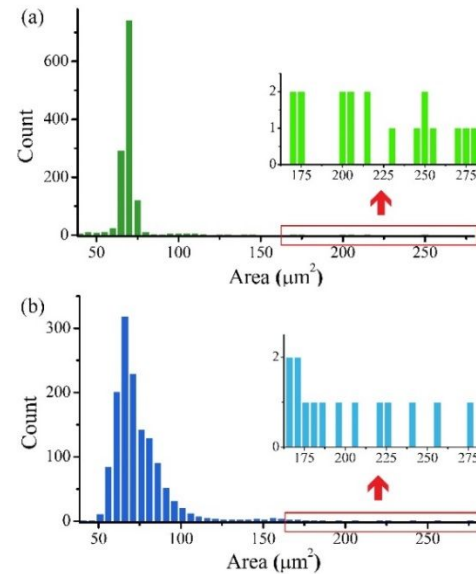


図 4: コールターカウンター(a)とタイムストレッチ顕微鏡(b)による検出精度の比較

がん細胞の薬剤応答（がん検診への応用）

がん細胞が抗癌剤などの薬剤に対して特徴的な形態的变化を示すことが以前から知られていた。この事実逆手に取って、タイムストレッチ顕微鏡を用いたがん細胞検出に応用できないか実験を試みた。例えば薬剤に対して耐性を持つがん細胞と耐性を持たない細胞が混合した集団から、薬剤耐性の細胞だけを抽出できる可能性がある。（図5）

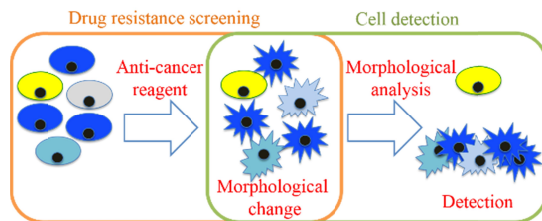


図 5: 抗癌剤による形態学的変化の誘導

我々は作用機構の異なる二種類の抗癌作用を持つ薬剤をヒトの乳がん細胞（MCF7/GFP）に加えてその薬剤応答を調べた。本研究で開発した蛍光検出機能に対応するために、蛍光タンパク質であるGFPを発現する乳がん細胞を用いた。一つ目の薬剤はラトルクリンA（Lat-A）であり、細胞骨格であるアクチン重合を阻害する働きを持つ。もう一つの薬剤はコルチシン（Colchicine）であり、細胞骨格の微小管重合を阻害する働きを持つ。表1から分かるように、この二種類の薬剤に晒されたがん細胞はそれぞれ特徴的な形態学的変化を示していることが確認された。

表 1: Lat-A とコルヒチンのMCF7/GFPに対する形態学的変化.

	未処理	処理済み	死細胞
Lat-A			
コルヒチン			

本実験において、我々はMCF7/GFP細胞に対して形態学的変換の観察に最適な薬剤反応条件を調べた。その結果、ラトルクリンAは0.25 μ Mを2時間、コルヒチンは0.5 μ Mを2時間反応させると最も特徴的かつ顕著な形態学的変化が観察できることが明らかになった。図6に示すように、我々はMCF7/GFPの形態学的変化をCCDカメラとタイムストレッチ顕微鏡の両方で確認した。図6aとdはコントロールとして薬剤を加えていない細胞の写真であり、黄色矢印で示しているように、細胞はなめらかな表面を呈している。図6bとeで黄色矢印が示すように、Lat-Aを加えた細胞では繊維上の形態を示すことが確認された。また、図6cとfの矢印が示すように、コルヒチンを加えた細胞は小さい泡のようなものを作ることが明らかになった。

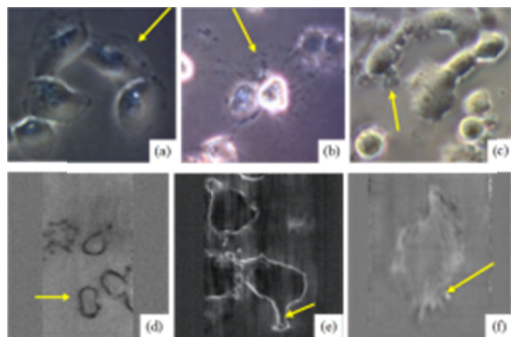


図 6: がん細胞の薬物応用 (左: コントロール, 中: Lat-A, 右: コルヒチン)。CCDによる写真 (a-c) タイムストレッチ顕微鏡による写真 (d-f)

我々はさらに得られた形態学的変化を定量的に評価するために、細胞の面積と周長を変数とした散布図を作成し、異なる薬剤反応条件に対して違いがないか調べた。図7aとbが示すように同じ薬剤で濃度が異なる場合では、散布図上での違いはほとんど見られなかった。しかし、それぞれの薬剤において、形態学的変化が最も顕著に表れる濃度に設定した場合、薬剤どうしの違いは明確に現れた (図7c)。0.25 μ MのLat-Aを加えた細胞は300-600 μ m²の面積と60-90 μ mの周長をもつ。一方0.5 μ Mのコルヒチンを加えた細胞は400-2000 μ m²の面積と80-200 μ mの周長を持つ。この結果から、タイムストレッチ顕微鏡を用いてがん細胞の薬剤応答を観察する際にも、面積と周長が有効な指標となりうることを示唆している。

4 - 2 . 凝固血小板の検出 (血栓症への応用)

血栓症は血小板が血中で異常な凝固を示し血管を塞いでしまう病気である。血小板自体は直径数ミクロンほどの大きさであるが、凝固した血小板は大きいもので直径数ミリメートルもの大きさになり、特徴的な形態を示すことが知られている。しかし、現在の技術で凝固した血小板を検出するためには、血液のプレパレートを作る必要があり、検出の効率が悪いのが問題点であった。我々の開発したタイムストレッチ顕微鏡は流れの中の物体を高速で撮像できるため、凝固血小板の検出に使えることが示唆されてきた。

そこで、我々は高速イメージングフローサイトメーターを用いて、血液中の凝固血小板の検出を試みた。予想された通り、採取されたヒトの血液の90%は赤血球であることが撮影された画像から確認された。(図8a)赤血球を溶血し取り除いた後、血小板を濃縮した検体を用いて、通常の顕微鏡とタイムストレッチ顕微鏡の両方で観察した。通常顕微鏡では、血小板を静止した状態で観察し、タイムストレッチ顕微鏡では血小板をマイクロ流路中で流れている状態で観察した。図8bとcが示すように、健康な血液中の血小板は凝固しておらず、通常顕微鏡とタイムストレッチ顕微鏡の両方で非常に小さな粒子として観察された。一方、凝固血小板は通常顕微鏡下で特徴的な形が通常顕微鏡より観察され、同様にタイムストレッチ顕微鏡からも同等サイズの同様な複雑さを持つ粒子として観察された。(図8dとe)

以上の結果から、タイムストレッチ顕微鏡は血中の凝固血小板が流れている状態でもはっきりとその特徴を画像として捉えることが示唆された。本発見はタイムストレッチ顕微鏡の臨床医療応用へ向けた重要な第一歩となった。

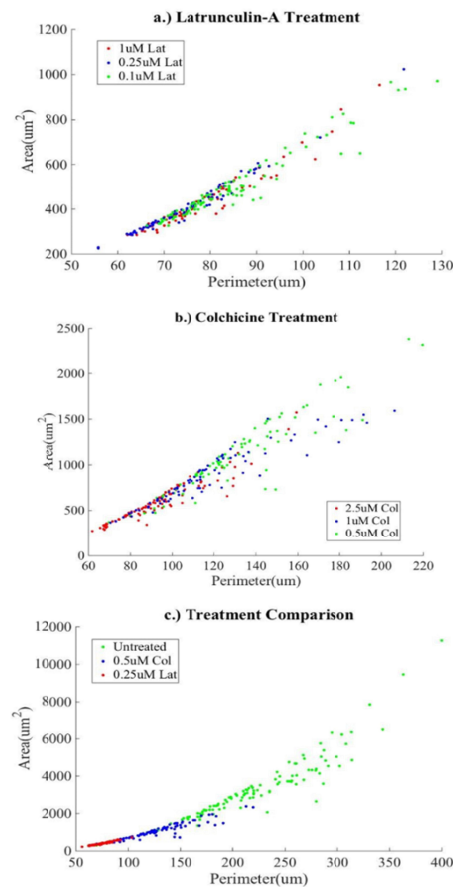
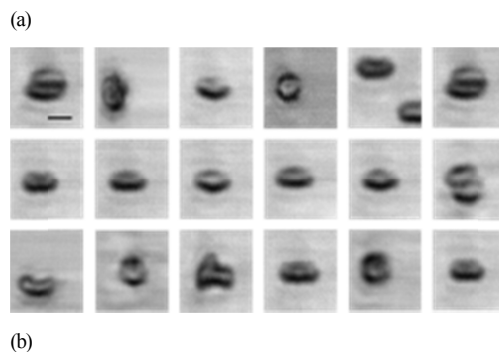
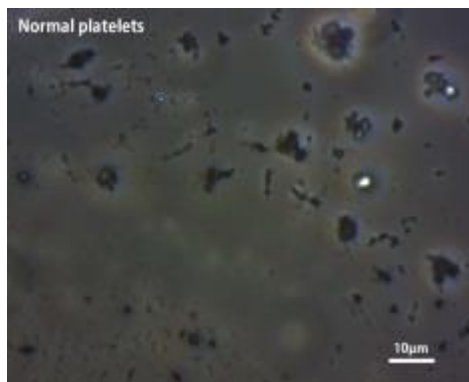


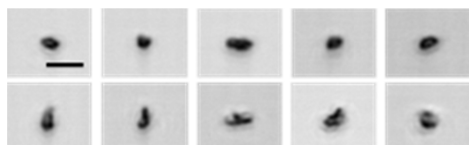
図 7: 異なる薬剤反応条件における面積と周長を変数とした散布図



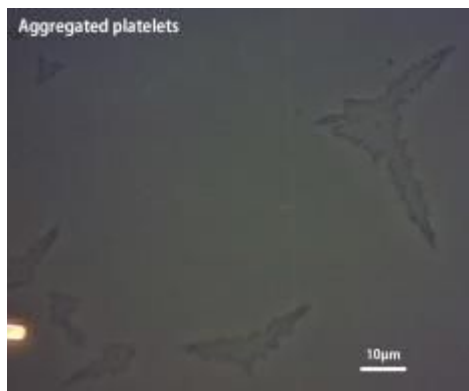
(b)



(c)



(d)



(e)

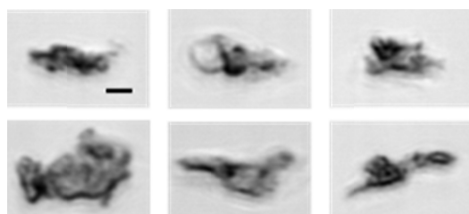


図 8. (a) 赤血球のタイムストレッチ像 (b) 通常顕微鏡によって撮像された健康な血小板と(c)タイムストレッチ顕微鏡によって撮像された健康な血小板。(d)通常顕微鏡によって撮影された凝固血小板。(e) タイムストレッチ顕微鏡によって撮影された凝固血小板。図(a), (c), (e)中のスケールバーは全て5 μmである。

最後に、我々はハイスループットのイメージサイトメトリーを構築し、形態的特徴と化学的特徴の両方を観測することに成功した。我々はさらに当装置の医療診断への応用としてがん細胞検出と凝固血小板の検出を試みた。その結果、がん細胞の薬剤応答を、形態学的変化を通して観察することに成功し、また、ヒトの血液に含まれる凝固血小板を流れの中で観測することにも成功した。本研究では、画像を使ったハイスループット医療診断の可能性を示しただけでなく、技術面でも多くの改善点や可能性を発見するきっかけとなった。我々はここで得られた結果を基にタイムストレッチ顕微鏡の医療応用に向けた実践的な開発をさらに進めていく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

M. Ugawa, C. Lei, T. Nozawa, T. Ideguchi, D. Di Carlo, S. Ota, Y. Ozeki, and K. Goda, "High-throughput optofluidic particle profiling with morphological and chemical specificity," *Optics Letters* 40, 4803 (2015)

C. Lei, B. Guo, Z. Cheng, and K. Goda, "Optical time-stretch imaging: principles and applications," *Applied Physics Reviews* 3, 011102 (2016)

C. Lei, Z. Cheng, and K. Goda, "Cancer detection with high-throughput image cytometry," *Medical Imaging Technology* 34, 3 (2016)

M. Ugawa, T. Ideguchi, and K. Goda, 「迅速・非侵襲に血中がん細胞を発見するカメラ」, *PET Journal* 28, 28 (2014)

M. Takahashi and K. Goda, 「超高速光イメージング技術を用いた低コストがん診断法」, *映像情報インダストリアル*, 5月号 (2013)

〔学会発表〕(計 6 件)

L. Cheng, M. Ugawa, T. Nozawa, D. Di Carlo, Y. Ozeki, and K. Goda, "High-throughput optofluidic microparticle analyzer based on time-stretch imaging," 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学 (2016)

C. Lei, M. Ugawa, T. Nozawa, T. Ideguchi, D. Di Carlo, S. Ota, Y. Ozeki, and K. Goda, "High-throughput time-stretch microscopy with morphological and chemical specificity," *SPIE Photonics West BIOS*, San Francisco (2016)

K. Goda, "Ultrafast optical imaging based on spatiotemporal dispersion," *Proceedings of 56th Meeting on Lightwave Sensing Technology*, Tokyo (2015)

K. Goda, "Extreme imaging and beyond," *Frontiers in Optics, OSA Technical Digest, LM2H.1* (2015)

M. Ugawa, T. Ideguchi, and K. Goda, "Ultrafast spectroscopy and imaging enabled by dispersive Fourier transformation," 第26回先端光量子科学アライアンスセミナー・先端光科学におけるフーリエ光学応用シンポジウム (2015)

M. Ugawa, B. Jalali, and K. Goda, "Dispersive Fourier transformation for spectroscopy and imaging of non-repetitive dynamics," 日本分光学会年次講演会 (2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: Apparatus and Method for Image-Activated Cell Sorting

発明者: 合田圭介

権利者: 合田圭介

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/80473

出願年月日: 2014年11月18日

国内外の別: 国内

名称: 撮像装置、フローサイトメータ及び撮像方法

発明者: 合田圭介, Cheng Lei

権利者: 合田圭介, Cheng Lei

種類: 特許

番号: 特願2015-203231

出願年月日: 2015年10月14日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

[その他]

テレビ出演①

NHK「サイエンスZERO」

2015年7月12日

テレビ出演②

BSフジ「革新のイズム」

2015年12月25日

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 圭介 (Goda Keisuke)

東京大学大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70518696

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者()

なし

研究者番号：