

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 高精度血液検査技術開発の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

セレンディピターを用いた血中稀少細胞の検出

研究開発機関名：

国立大学法人東京大学

研究開発責任者

矢富 裕

# I 当該年度における計画と成果

## 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

高精度血液検査技術の開発を目指した、セレンディピターの要素技術評価に関わる基礎検討を、ヒト血液を用いて行うとともに、末梢血における稀少細胞の検出に関して、とくにアテローム血栓症の制御を見据えつつ、本高精度血液検査技術の実証評価を行う。

### (1) セレンディピターの要素技術評価に関わる基礎検討

健常人検体、臨床検査の残余検体を用い、現在、稼働している自動血球計数器、フローサイトメーター、免疫組織染色とセレンディピターの算定データの比較検討を行い、それぞれの特徴と利点・欠点をまとめる。

### (2) 流血中の血小板凝集塊、血小板-白血球凝集塊の検出

健常人検体を用いて *in vitro* で血小板凝集塊を作製し、既存の装置（上記）とセレンディピターとで血小板凝集塊の検出率の違いを明らかにし、患者検体の評価時の検討項目をまとめ、パラメーターを設定する。可能であれば、アテローム血栓症を中心とした種々の患者検体を用いた臨床研究を進めるとともに、血小板凝集能装置としての応用の可能性について検討する。

## 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

### 2-1 進捗状況

セレンディピター製作の前段階として、一部要素技術のみを取り入れ製作を予定しているセレンディピターミニは現段階で完成していないため STEAM system と machine-learning を用いて画像解析を行い、健常人検体、*in vitro* での血小板凝集塊検体、臨床検体にて検討した。

### (1) セレンディピターの要素技術評価に関わる基礎検討

健常人検体と血小板凝集塊検体を用いて、自動血球計数器、フローサイトメーター、免疫組織染色と STEAM system で比較検討を行った。複数種類の検体を複数回検討することで、それぞれの利点・欠点を見出すことができた。臨床検体に関しても数回検討したが、STEAM system での血小板凝集塊の検出や白血病細胞の検出が十分ではなく、さらに追加での検討での必要である。

### (2) 流血中の血小板凝集塊、血小板-白血球凝集塊の検出

健常人検体を collagen および TRAP で刺激して血小板凝集塊を作成し、それらの検体を自動血球計数器、フローサイトメーター、免疫組織染色と STEAM system でそれぞれ測定を行った。複数回の検討から、学習用サンプルリストを作成し、machine-learning にて血小板、血小板凝集塊、白血球を区別することが可能となった。これを用いて臨床検体でも検討を行っているが、サンプルの処理条件が一定せず、現在も引き続き検討中である。

## 2-2 成果

- (1) セレンディピターの要素技術評価に関わる基礎検討
- (2) 流血中の血小板凝集塊、血小板-白血球凝集塊の検出

健常人の静脈血を collagen で刺激することで血小板凝集塊を作成した後に密度勾配法で赤血球を分離したサンプルを用いた。図 1 に示すように

STEAM system にて赤血球、血小板凝集塊と白血球の鑑別は可能であり、

machine-learning を用いることで図 2 に示すように明瞭に 3 群に分けることができた。machine-learning により算出されたパラメーターを用いることで定量評価も可能であり、臨床検体への応用が可能となった。一方、光学顕微鏡では図 3

のように観察され、白血球周囲の血小板の凝集が確認でき、白血球の種類を同定することが可能だが、STEAM system のような立体構造は失われ、定量性もない。フローサイトメーター (図 4) では血小板単体と血小板凝集塊を明瞭に分けることが可能で、血小板-白血球凝集塊も検出可能である。各白血球の抗体を用いることで、凝集塊の詳細を分類することも可能であるが、非常に少数となり、信頼性が保証できないのが欠点である。

以上のことから、STEAM system による血小板凝集塊の検出は in vitro モデル系では明瞭に分類することが可能で、定量性もあるが、臨床検体ではまだ血小板凝集塊の検出はできていない。

図 1. STEAM system

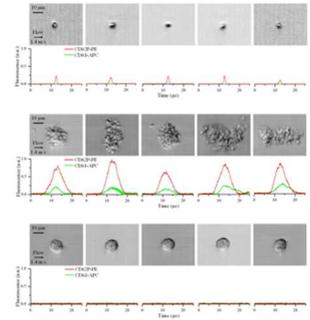


図 2. machine-learning

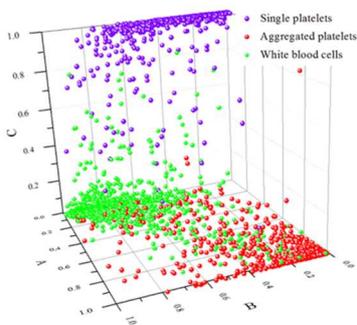


図 3. 光学顕微鏡

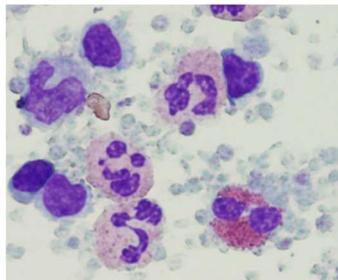
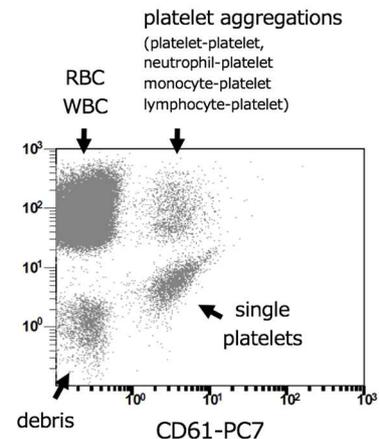


図 4. フローサイトメーター



### 2-3 新たな課題など

赤血球を除いた検体ではきれいに分類が可能であるが、赤血球も含む全血での解析はまだ成功していない。Throughput をあげることで赤血球を含む全血でも解析可能かどうかを検討すると同時に、血球の状態や血小板凝集塊を崩さずに赤血球を除くことが可能かどうかを検討している。

また、臨床検体でもフローサイトメーターでは検出されている血小板凝集塊を STEAM system では検出ができていない。この原因として検体採取から検査までの経過時間で崩れている可能性や、STEAM system の速い流速により崩れていることも考えられる。赤血球の分離のことと合わせて検討中である。

### 3. アウトリーチ活動報告

該当なし