

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 29 年度

研究開発課題名：

セレンディピターを用いた血中希少細胞の検出

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、血小板凝集塊の検出に関する実証評価を行う。

(1) セレンディピターに関わる基礎検討

健常人検体および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、塗抹標本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

当該年度の上半期はセレンディピター完成前であったため、OTS 顕微鏡 (Optofluidic time-stretch microscopy) による検討を継続した。下半期では、セレンディピターが完成したため、健常人のヒト血液検体を用いて、実証実験を行った。

(1) セレンディピターに関わる基礎検討

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、塗抹標本と OTS 顕微鏡で比較検討を行った。この検討では OTS 顕微鏡やセレンディピターでの測定における最適な検体条件を決めることができ、その後のセレンディピターでの検討がスムーズであった。

セレンディピターでの実証実験では、はじめに蛍光染色を行い検証したが、蛍光染色を施すだけで血小板凝集塊を誘導することが判明した。また、様々な年齢の健常人検体を用いて、無刺激と刺激とで比較した。健常者であっても若年者と比べて高齢者では血小板凝集塊ができやすく、またできた凝集塊も崩れにくいという特徴を見出し、主に高齢の健常人検体を用いることで、セレンディピターの基本性能を実証することができた。

(2) 流血中の血小板凝集塊、血小板-白血球凝集塊の検出

患者検体での検討の前に、健常人検体をトロンビン受容体 (PAR-1) 作動薬である TRAP で刺激して作成した血小板凝集塊を用いて、自動血球計数器、フローサイトメーター、塗抹標本と OTS 顕微鏡およびセレンディピターで検討した。OTS 顕微鏡、セレンディピターともに、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。ともに高精度に分類が可能となり、無標識にて識別が可能である。次年度から患者検体での検討を行う。

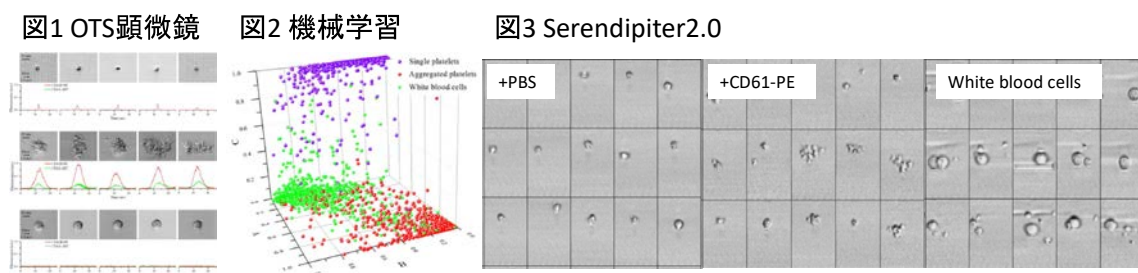
2-2 成果

- (1) セレンディピターに関わる基礎検討
- (2) 流血中の血小板凝集塊、血小板-白血球凝集塊の検出

健常人の静脈血をコラーゲンで刺激することで血小板凝集塊を作成した後、溶血固定溶液にて赤血球を除去、細胞固定したサンプルを用いた。図1に示すようにOTS顕微鏡にて赤血球、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に示すように高感度、高特異度に3群に分離可能であった。OTS顕微鏡ではコラーゲン刺激して意図的に血小板凝集塊を作成したサンプルを用いたが、本システムを発展させ、分取も可能となったセレンディピターでは無刺激のサンプルとTRAP刺激して作成した血小板凝集塊サンプルを同様に溶血固定して評価した。セレンディピターはOTS顕微鏡と同様に無標識での検出を可能としているが、確認で行った蛍光染色にて、図3のように緩衝液のみでは認めない血小板凝集塊が蛍光染色を行うだけで検出された。同じサンプルを同時に検体処理し、繰り返し再現性もあることから、血小板凝集塊の検出において、蛍光染色を行うこと自体が*in vitro*での刺激になることが示された。これまでフローサイトメトリー法で血小板活性化や血小板凝集塊の検出が報告されているが、いずれも蛍光染色が前提であることから、この知見は重要である。このことから以降の研究では無標識で**machine-learning**を用いて、単一血小板、血小板凝集塊、白血球の識別を行い、OTS顕微鏡と同等の高い検出率であった。また、血小板凝集塊の分取にも成功している。

また、様々な年齢の健常人検体を用いて、無刺激と刺激とで比較した。健常者であっても若年者と比べて高齢者では血小板凝集塊ができやすく、またできた凝集塊も崩れにくいという特徴を見出した。しかし、データ数が少ないため、追加で検証中である。

以上、将来の臨床応用に向けた基礎検討を進めることができた。また、セレンディピターにより、OTS顕微鏡と同等の高い検出率をもって血小板凝集塊の分取が可能になり、将来のオミックス解析への応用を考えている。



2-3 新たな課題など

in vitro で十分に凝集させた血小板凝集塊の検出および分取には成功しているが、微量にしか含まない患者検体での検討ができておらず、血液採取が一定ではないことによる影響なども未確認である。次年度にはアテローム血栓症の関連した患者サンプルを測定することで、実臨床への応用を視野に進めていく。

3. アウトリーチ活動報告

なし