

未来社会創造事業（探索加速型）

「共通基盤」領域

終了報告書（探索研究）

令和 3 年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名:野村 暢彦]

[筑波大学 生命環境系/微生物サステイナビリティ研究センター・教授／センター長]

[研究開発課題名:自家蛍光・情報処理に基づく Functional Imaging による細胞社会  
応答の解明と産業・医療への応用]

実施期間：令和 3 年 10 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

## §1. 研究実施体制

### (1)「野村」グループ(筑波大学)

① 研究開発代表者:野村 暢彦 (筑波大学生命環境系、教授)

② 研究項目 【データ取得と観察技術の構築】

腸内細菌、水処理、細胞育種、細胞不均一性、ウイルス・ベシクル・エキソソームに関して CRIF による 1 細胞レベルでの自家蛍光スペクトルの測定を行い、社会・産業ニーズを基に将来の社会実装を見据え、本提案手法が幅広い分野に応用できることを実証した。

- ・ 酵母(細胞育種)、細菌(腸内細菌)の自家蛍光プロファイルの取得
- ・ 水処理関連微生物の自家蛍光プロファイルの取得
- ・ 微生物細胞集団における細胞不均一性の自家蛍光プロファイルの取得
- ・ 自家蛍光プロファイルによるマイコプラズマ感染・非感染細胞の識別 (JCRB 細胞バンクとの共同研究)
- ・ 細菌の自家蛍光プロファイルに影響を与える代謝産物の同定と検出 (島津製作所との共同研究)

### (2)「松島」グループ(東京理科大学)

① 主たる共同研究者:松島 綱治 (東京理科大学生命医科学研究所、教授)

② 研究項目 【医学・臨床応用に向けた動物細胞の自家蛍光プロファイリング】

自家蛍光スペクトルに基づき 1 細胞レベルで無処理・非破壊・非侵襲に細胞の機能・正常を把握できる Functional Imaging は、がんや炎症性疾患における異常細胞の非侵襲的な検出・診断や、今後ニーズの高まる再生医療における品質管理の強力なツールとなりうる。そこで探索期間では、培養動物細胞やマウス組織由来細胞について CRIF による 1 細胞レベルでの自家蛍光スペクトルの測定を行うことで、応用可能性の実証と解決すべき課題を明らかにした。

- ・ がん細胞および正常細胞の自家蛍光プロファイルを取得
- ・ マウス組織由来細胞について自家蛍光プロファイルと免疫表現型との照合

### (3)「櫻井」グループ(筑波大学)

① 主たる共同研究者:櫻井 鉄也 (筑波大学システム情報系、教授)

② 研究項目 【情報処理技術の構築】

細胞は種やその状態によって異なる自家蛍光パターンを持つ。櫻井グループでは、測定された自家蛍光サンプルに合わせた細胞分別 AI 技術の構築を行った。具体的には、細胞分別に重要な特徴量(波長)の抽出・設計を行い、ケースごとの分別モデルの開発を進めた。また、ケースによる主要特徴量(波長)の差異についても解析を行った。

- ・ プライバシー保護計算技術である「データコラボレーション解析」の有効性の検証

### (4)「佐瀬」グループ(株式会社ニコン)

① 主たる共同研究者:佐瀬 一郎 (株式会社ニコンヘルスケア事業部技術統括部システム開発部、部長)

② 研究項目 【ソフトウェアの開発】

CRIF による観察画像から各細胞をセグメンテーション、そのセグメンテーションされた細胞毎のプロファイルデータを自動で計測するソフトウェアを開発した。また、撮影視野内に存在する大量な細胞集団の個々のプロファイルデータをデータベース化し、細胞集団の全体的な特徴、及び集団属性を評価する解析機能も開発した。

- ・ 酵母、がん細胞の観察画像から各細胞をセグメンテーション、そのセグメンテーションされた細胞毎のプ

## §2. 研究開発成果の概要

本研究グループが開発した CRIF 顕微鏡システムを用いることで、水圏や土壌など様々な環境中に生息している微生物集団(活性汚泥や腸内細菌など)における1細胞の自家蛍光プロファイルを取得した。さらに、これらの自家蛍光プロファイルを機械学習させた AI により、各々の細胞の種類や状態を識別できることを実証した。これらの成果は、本顕微鏡システムが継時的な微生物叢モニタリングなど様々なシーンでの使用可能であることを示唆している。また、CRIF 顕微鏡システムが、微生物集団の細胞間コミュニケーションの有無を検出できること、有用代謝産物の高生産酵母を識別できること、マイコプラズマ感染細胞を識別できることなど、微生物に係る基礎から応用研究まで幅広い用途に利用できることも明らかにした。また、動物細胞の自家蛍光プロファイリングを進め、無処理・非破壊でマウス骨髄細胞の赤血球・白血球の別に加え、リンパ球と顆粒球の分別に成功した。微生物だけでなく、動物細胞の細胞種までも見分けられることを実証できた。微生物集団が形成するバイオフィームは、細胞が高密度に集合した三次元構造であり、バイオフィーム内部や界面に存在する細胞まで観察する必要性が想定される。そこで、屈折率の調整によってガラス表面などの固液界面付近の細胞観察や透明化処理によるバイオフィーム内部の細胞まで観察を可能とすることで、今後、障害となり得る問題点をクリアした。さらに、Deep learning を用いることで、細胞のダメージを抑えるためにレーザーを減弱させて取得した SN 比の悪い画像から良い画像を予測できることも実証したほか、自家蛍光プロファイルのデータが異なる機関に跨って存在していても解析できる「データコラボレーション解析」の有効性の検証も行った。自家蛍光プロファイルの解析ソフトウェア開発では、高精度でセグメンテーション(1 細胞領域認識)が可能なアルゴリズムを画像解析ソフトウェアに実装することで、専門的な知識・スキルを要せず、誰もが簡単に自家蛍光プロファイルの解析を行えるよう改良を施し、実際に使い勝手が大幅に向上した。このように本格研究に向けた探索研究の開発項目を概ねクリアできたと考えている。

### 【代表的な原著論文情報】

- ① Okano C, Takabe K, Hirayama T, Nomura N, Yawata Y (2021) Three-dimensional morphology of bacterial community developed on the index-matched materials. *Sci. Rep.* 11, 19508, doi: 10.1038/s41598-021-98943-4.
- ② Bamba K, Takabe K, Daitoku H, Tanaka Y, Ohtani A, Ozawa M, Fukamizu A, Nomura N, Kohara A, Kunoh T. (2024) Discrimination of mycoplasma infection using machine learning models trained on autofluorescence signatures of host cells. *Sens Diagn* 3 :287-294. doi 10.1039/d3sd00175j.