

# 研究報告書

## 「新規高速高感度イメージングによる超高速蛍光画像サイトメトリー」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成26年10月～平成30年3月

研究者：太田 禎生

### 1. 研究のねらい

大量でヘテロな複雑細胞社会を理解するために、一つ一つの細胞を多角的に評価する必要は高まるばかりです。光計測解析技術は非破壊で迅速なプライマリー細胞評価であり、細胞内分子局在や形態情報を光学的に判別して、細胞集団を高速かつ正確に分離できれば広く生命医学に有用となります。しかし従来光学顕微鏡に基づいた細胞分離技術はスループットにおいて多くの実用に足りず、高速に細胞分類できる既存フローサイトメーターは散乱・蛍光強度情報のみを計測するにとどまり、豊富な細胞形態データを諦めてきました。現状の技術では、例えば十万以上の細胞の核形状を短時間で観察し、迅速にがん細胞を取り分ける事は容易ではありません。そこで1細胞毎の計測における情報量とスピードを両立する蛍光形態判別型セルソーターが必要となりますが、その実現には、①高感度、多色、高速、連続撮影を行える蛍光イメージングと、②爆発的に発生する細胞画像データをリアルタイム処理して細胞分取を実現する情報解析、という両問題を同時に解決する必要がありました。

そこで本研究では、人が読み取れる画像を作るためのイメージング計測、画像ありきの形態解析、という従来個別概念を一旦離れ、大量細胞の形態データを活かす一点にかけて再考しました。その結果、ヒトの介在を諦め、機械学習に委ねて「画像を捨て、形態を見る」発想にたどり着き、光学ハードウェアと情報技術を密に融合して①②をシンプルに一挙解決しました。具体的には、細胞の「動き」を利用する事で細胞形態情報を高速計測し、計測信号に対して直接、画像再構築せずに機械学習によるリアルタイム形態判別を実行し、マイクロ流体技術を組み合わせる事で世界初の高速蛍光形態判別型セルソーターの実現を目指しました。そして、広い分野における医学応用を模索して、特にがん診断並びに再生医療分野における応用研究の展開を狙いました。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、細胞の蛍光形態情報に基づいて類似または複雑な細胞集団を高速に分類し、選択的に分取できる蛍光形態判別型セルソーターを、世界で初めて実現しました。本研究の成果は、(A) 新規高速多色蛍光動的ゴーストイメージング技術 Ghost Motion Imaging (GMI)法、(B) 機械学習駆動型画像なしイメージングフローサイトメトリー技術 Ghost Cytometry (GC)法、そして(C) 機械学習駆動型画像なしイメージングセルソーター技術 Ghost Cell Sorter (GCS)法、という三つの技術開発、並びにその応用に大別されます。

まず GMI 法では、ランダム構造照明と細胞間の相対的な「動き」を用いて細胞の空間情報を圧縮変換し、時間情報として高速・高感度計測し、多色蛍光画像を計算機内で再構成しました。マイクロ流路を流れる蛍光標識された細胞の高速多色蛍光イメージング（数千～万細胞毎秒）を行い、高速・高感度・多色・安価・コンパクトな新規イメージング技術として実証しました。

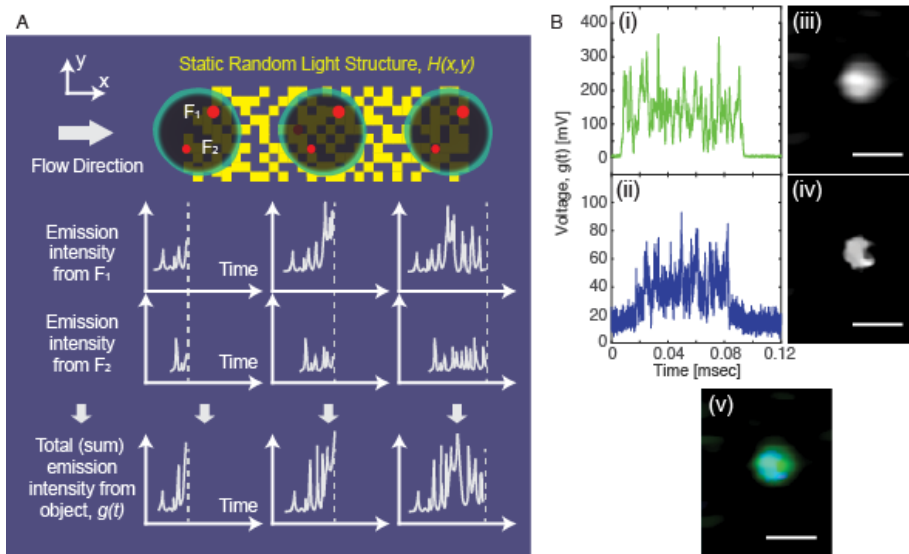
次に GC 法では、高速圧縮計測された時間波形信号を、機械学習モデルを用いて直接高速判別しました。画像再構成プロセスをスキップし、時間波形は圧縮されているため、計算機への要求は格段に下がり、低コスト・高速化が容易となり、画像再構成に伴うノイズやバイアスも回避されます。機械学習手法としては教師有り学習を用い、人の目で見ても見分けるのが難しい形の似た細胞群や、複雑な細胞社会であるモデル血中にスパイクしたガン細胞を、高いスループット計測（～万細胞毎秒）と高い精度（類似細胞同士を Area Under the Receiver operating characteristic Curve (AUC) ～0.94、血中ガン細胞を AUC ～0.97）で検出に成功しました。

最後に GCS 法では、細胞を整列し、光学系計測を行った後、同一マイクロ流路内において判別結果に基づいて選択的に細胞をリアルタイム分取するマイクロ流体システムを開発し、上記 GC 法（計測と判別）と組み合わせる事により、機械学習駆動型の細胞形態に基づいた高速（数千細胞毎秒）かつ高精度な細胞分取を実現しました。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「新規高速多色蛍光イメージング技術 Ghost Motion Imaging 法の開発」

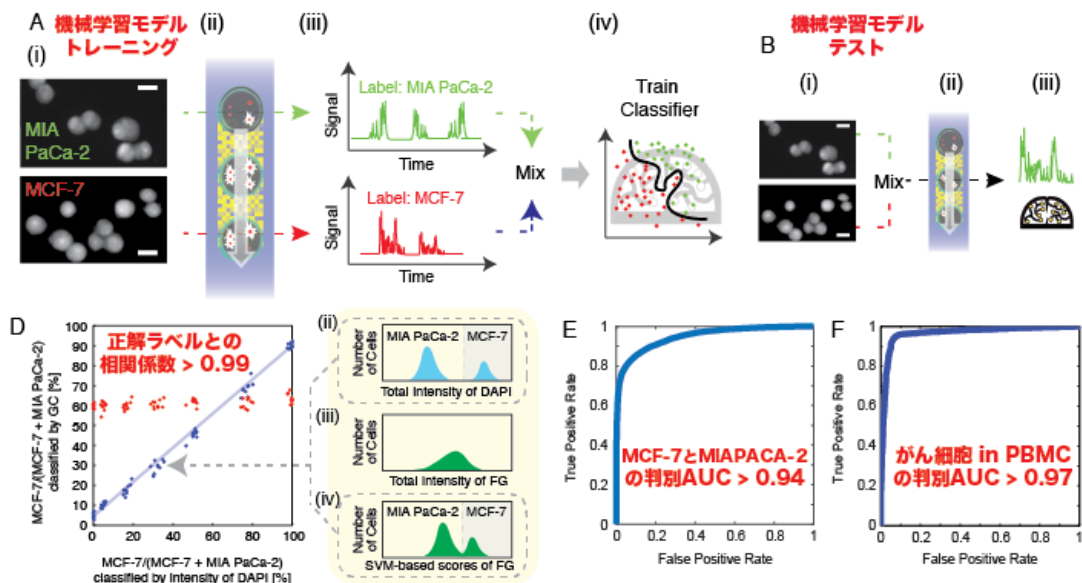
GMI 法では、一般的に使われているアレイ型の低速な高感度カメラは使いません。圧縮センシングに基づいて設計された回折素子を用いて投影された静止ランダム構造照明を細胞に通過させ、発生する蛍光総量を高速・高感度な1画素素子で時系列信号として計測しました(下図左)。既知の構造照明情報を用いる事により、時間波形から蛍光画像の再構築を、計算機的に実証しました。さらにランダム構造が光学系に入っているだけで実現できるシンプルさを活かし、多色蛍光イメージングも実証しました。そして流路中を万細胞毎秒のスピードで流れる蛍光標識細胞の、多色蛍光イメージングも実証しました(下図 B)。



**研究テーマ B「機械学習駆動型画像なしイメージングフローサイトメトリー技術 Ghost Cytometry 法の開発」**

GC法では、GMIで万細胞毎秒のスピードで高速圧縮計測された時間波形信号を、機械学習モデルを用いて直接高速判別しました。時間波形を見ても私達ヒトには細胞形態を判別できませんが、機械であれば波形に畳み込まれた細胞形態情報を判別できるのがポイントです。画像再構成プロセスをスキップできるだけでなく時間波形は圧縮されているため、計算機への要求は格段に下がり、低コスト・高速化が容易となり、画像再構成に伴うノイズやバイアスも回避されます。Field Programmable Gate Array 高速処理回路に実装する事で、細胞分取に必要な高速リアルタイム処理を実現しました。

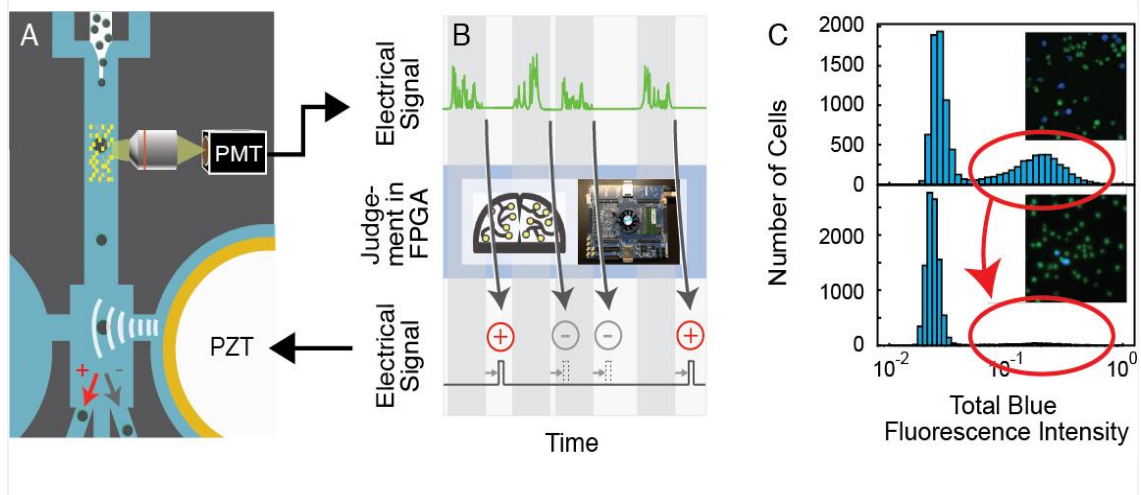
機械学習による細胞形態判別力の検証に際しては、まずサイズが同様に形態も似た癌細胞二種 MIA PaCa-2/MCF-7 の、細胞質を同様に染色したものを用意しました。まず細胞種毎に流路に流し、時間波形を計測して ラベル付け(細胞種の名前を紐付け)し、機械学習分類器を計算機内で生成しました(下図 A)。次に異細胞種を前もって混ぜ合わせ、流路を流して信号計測を行い、先の判別器で細胞種を分類しました(B)。本手法における、学習ならびにテスト時は、万細胞毎秒の高スループット条件が用いられました。(D-iii)に示すように従来通りに蛍光総量を見てもヒストグラム上で細胞を分類できませんが、時間波形に対して機械学習モデルを適用すると、(D-iv)のようにスコア関数のヒストグラムは二山に分かれます(つまり形態分類できる)。片方の細胞種の核を別色で染色し、機械学習分類の答え合わせを数万細胞に対して行ったところ(D-ii)、Area under the receiver operating curve (AUC)指標 > 0.94(E, 現在も向上を続け 0.97 程度)という高い精度での判別が達成されました。さらにモデルがん細胞のモデル血中検出も行い、AUC > 0.97(F, 現在は 0.99 以上)の高精度で判別を達成しました。なお本検証では、教師有り機械学習として Support Vector Machine (SVM) が用いられましたが、SVM に限らず、深層学習や、教師無し機械学習を含む多様な手法が適用でき、発展著しいデータ科学の充実とともに可能性は広がっていくと考えられます。



## 研究テーマ C「機械学習駆動型画像なしイメージングセルソーター技術 Ghost Cell Sorter の開発」

光・情報・細胞技術の融合し、非破壊に、細胞内分子局在や形態情報を機械学習で高速判別し、細胞集団を高速かつ正確に分離できる、高速オンチップセルソーターを実現しました。上記 GC 法において実証された時間波形を直接判別する機械学習判別モデルを、Field Programmable Gate Arrays (FPGA) 上に実装する事で、安価かつ高速な細胞形態判別を実現し、マイクロ流体技術と組み合わせる事によりリアルタイム細胞分取を実現しました。まずマイクロ流体技術により細胞流線を三次元的にフォーカスし、ランダム構造照明を通過させる事により時間波形を発生・計測し(下図 A)、アナログ信号をデジタル変換し、FPGA を用いて波形を判別し、判別結果(下図 B、回収パルス発生)は高圧アンプを通して、マイクロ流路に戻ってきてピエゾ素子を駆動し、ピエゾが発生する細胞流線に垂直な流れにより、下流分岐路に向けて細胞を選択的に振り分ける機構を完成させました。本プラットフォーム実験的実証において、計測スループットは数千細胞毎秒で行われました。

実証においては、GC において用いられた、形態が似ている癌細胞ライン二種 MIAPACA-2/MCF-7 の細胞質を同様に緑染色し、正解づけを MCF-7 のみ青染色で行いました。GCS により細胞ライン混合物をソートした所、片方の細胞ラインのみを濃縮する事に成功しました。下図 C にあるようにヒストグラム上で青染色ネガティブな MIAPACA-2 細胞が濃縮されており、回収した細胞の顕微鏡写真からも明らかです。本システムでは MIAPACA-2/MCF-7 の判別・ソート後 purity で 0.95 程度という非常に高い値を得ています。さらにモデル血(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)中にスパイクした、モデル循環がん細胞検出ならびに分離実証も実現し、様々な対象に応用を展開しています。



### 3. 今後の展開

本研究で開発された機械学習駆動型画像なし蛍光イメージングセルソーター技術 Ghost Cell Sorter は、大量細胞から形態に基づいて少数細胞を単離でき、下流のより精細な1細胞解析技術へと繋げる事ができ、1細胞に関する科学と産業の両面において大きな応用可能性を秘めています。特に血液、がん、免疫分野などにおいて応用研究開発を進めます。

また本研究で提案・実現された、物体の動きを利用した光学高速計測、画像再構築を必要とし

ない物体の形態情報判断は、蛍光イメージング以外にも適用可能です。特にラベルフリーイメージング技術には大きな応用可能性があり、開発を目指します。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

###### ・研究目的の達成状況

新規光学計測手法と機械学習の有機的な融合により、データの本質的利用を追求したアイデア(画像化する事なく賢く処理)を実現し、高速蛍光イメージングセルソーターを世界に先駆けて実現できました。当初は様々な困難に直面して研究にも遅れがりましたが、周りの方々の多大なるサポートもあって目的達成に辿り着くことができました。さらに当初の計画に無かった、新技術群の開発、様々な共同の生命科学応用研究、実用化共同研究が加速しています。全てを实らせられるように、引き続き精進します。

###### ・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

当初予定していた研究実施体制を修正しつつ、現研究室と技術補佐員等、JST のサポートを通し、さきがけ専任研究を全うできました。研究費は、レーザーやディテクターなどの光学機器、計算機や FPGA といった電気・情報機器などの購入に使われ、本研究結果へと結び着きました。

###### ・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

研究成果は、産業実用化を進め、理化学機器や医薬応用を通して、社会・経済へと着実に大きなポジティブな効果が波及すると、大いに期待されます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック・1期生成果評価会での総括・AD 間の議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ランダム構造照明と相対的な動きを用いて細胞形態情報を時間情報として高速・高感度・コンパクトに計測・圧縮変換する Ghost Motion Imaging(GMI)技術を開発し実証しました。次に圧縮された時間波形信号を機械学習モデルを用いて判別する高速・低コストの Ghost Cytometry(GC)技術を開発しました。さらに、細胞を整列し、光学計測の結果に基づいて選択的に細胞をリアルタイムに分取するマイクロ流体システムを開発し、GC 技術との組み合わせによって機械学習駆動型の細胞形態に基づいた高速・高精度な細胞分取を実現する Ghost Cell Sorter に発展させました。今後、1細胞解析に広く使われる重要な基盤技術に育つことが期待されます。

特に当初提案した Ghost Motion Imaging のアイデアだけでなく、機械学習との組み合わせへの展開が素晴らしく、高く評価できます。また、技術の開発にとどまらず、このアイデアを実装した計測装置の開発が進んでおり、当初の課題は十二分に達成されたと言えます。本技術を世界レベルでアピールするためにも、知財の確保・製品化だけでなく、一刻も早く

publication を達成して欲しいと願っています。

本研究は、日本生物物理学会若手奨励賞を受賞しています。さらに、さがけ1細胞解析研究領域の総括・領域 AD からなる評価会議から、H26 年度採択のさがけ 1 細胞解析領域の研究課題の中でも特に新しい技術の開発に優れた成果を上げたとして、Innovation 賞を贈ったことを申し添えます。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

該当なし

### (2)特許出願

研究期間累積件数:11 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1. 発明者: 太田禎生、堀崎遼一、橋本和樹  
発明の名称: 動的高速高感度イメージング装置及びイメージング方法  
出願人: 東京大学、大阪大学  
出願番号: PCT/JP2016/055412
2. 発明者: 太田禎生、堀崎遼一、佐藤一誠、藤生克仁、山口聡子、板橋踊子、脇嘉代  
発明の名称: 機械学習により自動的に高速・高感度・高精度化する次世代多次元情報フローサイトメリーの要素機構、及びその統合システム  
出願人: 東京大学、大阪大学  
出願番号: PCT/JP2016/082089

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. Sadao Ota, Hiroyuki Noji Ghost Cytometry – Machine Learning Driven Imaging Flow Cytometry 第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2017/8/28
2. Sadao Ota Ghost Cytometry – Machine Learning Driven Imaging Flow Cytometry– 第 55 回日本生物物理学会 2017/9/19
3. 太田禎生 新規高速高感度イメージングによる超高速蛍光画像サイトメリー 第 41 回日本分子生物学会年会 (ConBIO2017) 2017/12/6
4. Sadao Ota 機械学習駆動型高速ハイコンテツサイトメリー 第 41 回日本分子生物学会年会 (ConBIO2017) 2017/12/9

#### 受賞

1. 太田禎生 OPJ ベストプレゼンテーション賞 プラズモン・ナノレーザーによる超高速感度ガス分子センシング 2014 年 11 月 12 日

2. 太田禎生 日本生物物理学会若手奨励賞(平成28年度) Ghost Cytometry  
2016年11月26日

#### 著作

1. 太田禎生 ゴーストサイトメトリー:機械学習駆動型蛍光“イメージング”フローサイトメトリー  
生体の科学 10月号 Vol.68, No.5, pp. 404-405 2017/10/15
2. 太田禎生 “機械の目で形態を“見る” ゴーストサイトメトリー”  
実験医学別冊:あなたのラボにAI(人工知能)×ロボットがやってくる～研究に生産性と  
創造性をもたらすテクノロジー 2017/12/8

#### その他

日経バイオテク平成28年10月10日号「若手研究者の肖像」(第18回)  
異分野融合で革新的細胞測定法を開発産学の両輪で先端技術の実用化に挑戦