

●——— 磁気浮上マイクロ流体と自動画像解析を

融合した循環腫瘍細胞クラスター解析

血中を循環する腫瘍細胞 (CTC) およびその集合体である CTC クラスター (CTCC) は、転移リスク評価、治療効果予測、薬剤耐性モニタリングなどへの応用が期待される重要なバイオマーカーである。しかし存在頻度が極めて低く、分離・検出・定量の各段階で高い分析的困難を伴う。特に複数蛍光マーカーを用いた 2D/3D 画像の目視カウントは時間と熟練を要し、臨床応用の障壁となっていた。近年、安価な永久磁石を用いて細胞を浮上・分離する磁気浮上型マイクロ流体デバイスが、細胞ソーティングや物性プロファイリングに利用されている¹⁾²⁾。パラ磁性媒質中では、細胞に作用する磁気力、浮力、重力が釣り合う高さに細胞が浮上するため、細胞の実効密度や磁気感受性の差が空間位置として分離される。腫瘍細胞と非腫瘍細胞では平衡浮上位置が異なり、一般に腫瘍細胞は非腫瘍細胞の上方に位置する。この原理によりラベルフリー分画が可能であり、低コスト小型な分析デバイスとして注目されている。こうした背景のもと、米国 Stanford 大学の Durmus らのグループは、磁気浮上分離で CTC/CTCC を分離し (図 1 (a))、多色免疫染色、蛍光イメージング、自動画像解析を統合した分析フローを構築した (図 1 (b))³⁾。磁気浮上後の画像は不均一照明や染色アーティファクト、細胞密集の影響を受けやすい。Durmus らはこの測定環境に最適化した

(a) 磁気浮上選別 (Magnetic Levitation Sorting, MLS)

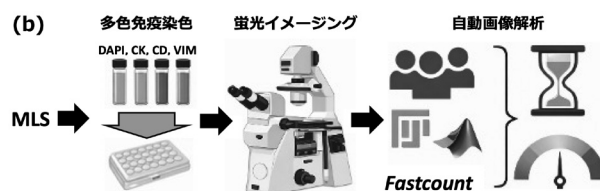
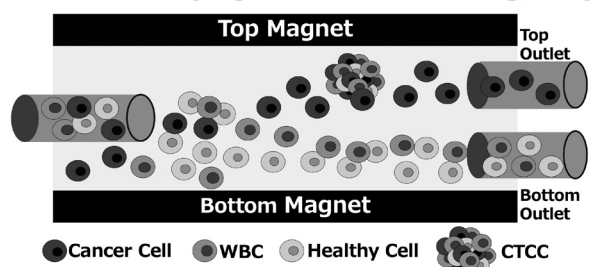


図 1 (a) 磁気浮上マイクロ流体デバイスでの CTC/CTCC 分離; (b) 多色免疫染色, 蛍光イメージング, 自動画像解析を統合した解析フロー

Adapted from Ref. 3 under CC BY 4.0 license.

画像解析アルゴリズム「Fastcount」を開発した。Fastcount では、デコンボリューションおよび局所コントラスト補正による前処理後、適応的閾値処理と形態学演算により細胞領域を抽出し、複数蛍光チャネルの論理演算と Z スタック統合により細胞タイプ分類および 3D クラスター解析を自動化している。600 枚超の臨床画像において、1 検体あたり数十分を要していた手動解析を数十秒レベルに短縮し (約 120 分の 1)、同等精度を維持した。さらに、3D 解析により CTCC 内細胞組成の不均一性を定量可能とした点は特筆に値する。本研究は、分離・計測・情報処理を一体の分析システムとして設計し、ハードとアルゴリズムを同時最適化する計測インフォマティクスのアプローチの好例である。一方で、蛍光染色品質やクラスター過密度への依存性などの限界も残されている。今後、分光イメージングやオンチップ反応系との融合により、細胞集団の階層的な不均一性評価への展開が期待される。

- 1) N. G. Durmus, H. C. Tekin, S. Guven, K. Sridhar, A. A. Yildiz, G. Calibasi, I. Ghiran, R. W. Davis, L. M. Steinmetz, U. Demirci : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, E3661 (2015).
- 2) B. Karakuzu, M. A. İnevi, E. A. Tarim, O. Sarigil, M. Guzelgulgen, S. Kecili, S. Casmeli, S. Koc, M. S. Baslar, C. O. Karakus, E. Ozcivici, H. C. Tekin : *Emergent Mater.*, **7**, 2323 (2024).
- 3) M. G. Ogut, P. Ma, R. Gupta, C. R. Hoerner, A. C. Fan, A. N. El-Kaffas, N. G. Durmus : *Adv. Biol.*, **7**, e2300109 (2023).

〔北見工業大学工学部 三浦 篤志〕

●——— Low-density lipoprotein の分析技術

リポタンパク質は、アポリポタンパク質、リン脂質、トリグリセリド、コレステロールエステルから構成されるタンパク質複合体であり、消化管から吸収された脂質や肝臓で合成された脂質を血管内輸送する重要な役割を担っている。Low-density lipoprotein (LDL) は血液中を循環する過程で、活性酸素種や糖、リポキシゲナーゼなどの化学物質や酵素による修飾を受けることがあり、これらは LDL 受容体への親和性を低下させる可能性がある¹⁾。化学的・酵素的修飾のリスクは血液中での長期循環により増加し、修飾された LDL は CD36, Lektin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) などのスカベンジャー受容体によって認識されるが、これら修飾 LDL はいずれも心血管疾患の発症に関与することが知られる。代表的な修飾 LDL の一つである酸化 LDL はアテローム性動脈硬化発症の危険因子であるため、注目を集めている。

武田らは、LDL の酸化修飾が LDL 受容体や LOX-1 の結合特性に与える影響を解析するため、酸化 LDL とリコンビナント LDL 受容体 (reLDLR), リコンビナント LOX-1 (reLOX-1) を用いて、バイオレイヤー干渉法 (BLI) と原子間力顕微鏡 (AFM) による評価を行った²⁾。

著者らはインキュベーション時間の差を利用して、異

なる酸化状態の酸化 LDL を調製し、各酸化 LDL と、reLDLR、reLOX-1 との結合特性をそれぞれ BLI で解析した。その結果、LDL の酸化時間と、reLDLR との結合特性において、LDL の酸化時間の増加に伴い、reLDLR との結合が減少する負の相関がみられた。一方、酸化 LDL と reLOX-1 との結合特性においては、LDL の酸化時間の増加に伴い、reLOX-1 との結合が増加する正の相関がみられた。次に著者らは、BLI 測定後のセンサーチップの表面の reLOX-1 に結合する酸化 LDL の分布について、AFM を用いた解析を試みた。酸化 LDL は一様ではなく様々な大きさのものが分布して存在しており、さらに酸化 LDL は凝集しやすい特性があることから、AFM による表面解析は reLOX-1 と酸化 LDL の結合解析のより詳細な理解の一助となる。実際に AFM を

用いた表面解析の結果、センサーチップ表面にはヤング率の異なる粒子が存在することがわかり、酸化状態の異なる酸化 LDL 群が reLOX-1 に結合していること、また一部凝集体の吸着の可能性が示唆された。

生体分子の相互作用解析を得意とする BLI と、表面構造の解析が可能な AFM の特徴を組み合わせる本手法は、結合解析をより明確にする手段の一つとして有用な例であるといえる。本分野の今後益々の発展に期待したい。

- 1) H. Yoshida, R. Kisugi : *Clin. Chim. Acta*, **411**, 1875 (2010).
- 2) S. Takeda, A. Hamamuki, K. Ushirogata, T. E. Takasuka : *Biophys. Chem.*, **300**, 107069 (2023).

〔北海道科学大学 比留間 貴久〕

原稿募集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器、分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術、2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術、3) 分析機器および分析手法の応用例、4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説、5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項、6) その他、分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情報など

報など

新規性：本記事の内容に関しては、新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく、既存の装置や技術に関わるもので構いません。また、社会的要求が高いテーマや関連技術については、データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

〔E-mail : bunseki@jsac.or.jp〕