

血中浮遊癌細胞を単離できるマイクロ流体チップシステムに関する研究

材料技術課 大永 崇 加工技術課 小幡 勤
富山大学大学院医学薬学研究部 嶋田 裕、岸 裕幸

1. はじめに

癌の治療や研究において、癌細胞を直接解析する重要性が認識されてはいるものの、その採取は大きな身体的負担が伴うことなどから一般に容易ではない。一方、近年の研究により、癌の初期段階から末梢血中に癌細胞が存在することが明らかにされており¹⁾、このような血中の細胞を単離できれば癌細胞を容易に採取できる。しかし血中の癌細胞濃度は極めて低いため、通常分離技術では血液が大量に必要となり、現状では実質的に癌細胞の単離は不可能となっている。

最近、少量の血液から効率よく癌細胞を単離する方法として、マイクロ流体チップを利用した手法が研究されている²⁾。シリコンウエハを加工したマイクロチップの流路に、血中には存在しない癌細胞表面のタンパク質の抗体を固定化し、数 ml の血液を流して癌細胞を捕捉する方法 (図 1 参照) が開発されている。

本研究は、上記研究をもとに工業技術センターのマイクロチップ研究と富山大学の癌、免疫研究とを融合し、より高性能な血中浮遊癌細胞を単離できるマイクロ流体チップ (CTC チップ) を開発することを目標に開始した。細胞捕捉効率の向上、チップの大量供給・コストダウンなどについて検討し、併せて安全に血液を送液し細胞の捕捉・同定ができるチップシステムの開発を行ったので、以下に報告する。

2. マイクロチップ作製とチップシステム開発

文献²⁾ のチップ構造を参考にしてフォトマスクを用意し (外注による)、工技センター設備で樹脂チップ成形のための鋳型 (シリコン製) を製作した。次にこの鋳型を用い筆者らが開発した光硬化性樹脂および成形方法によ

り CTC チップを作製した。得られたチップの外観および拡大像を図 2 に示す。細胞捕捉のためのマイクロポストが格子状に規則正しく配列した構造が認められ、チップ構造が問題なく成形できることを確認した。ここで用いた成形法では、1 サイクルが数分程度で原材料費も安価なため、チップの大量供給・コストダウンが可能である。

このようにして得た CTC チップに蓋をして送液チューブ等を接続するためにチップホルダを開発し特許出願した (特願 2011-055871 号、図 5 参照)。さらにポンプ、揺動機 (サンプル攪拌用)、蛍光位相差顕微鏡、カメラシステムなどを組み合わせ、サンプル液を送液し細胞の捕捉・同定ができるチップシステムを開発した (図 3 参照)。

3. 抗体固定化と癌細胞捕捉試験、血液送液試験

チップへの抗体固定化方法として(1)物理吸着(2)表面官能基との共有結合(3)表面ポリマーとの共有結合、について検討した。蛍光標識抗体を用いて蛍光強度より抗体固定化量を評価したところ(3)が最も多かったので、以下では(3)の方法を用いた。

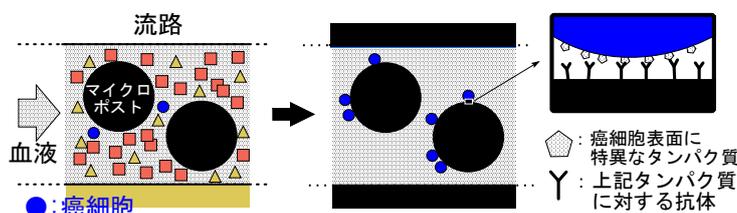


図1 マイクロチップによる癌細胞捕捉

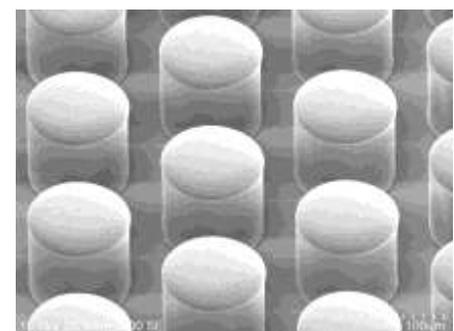


図2 CTCチップの外観と拡大像



図3 チップシステム概観

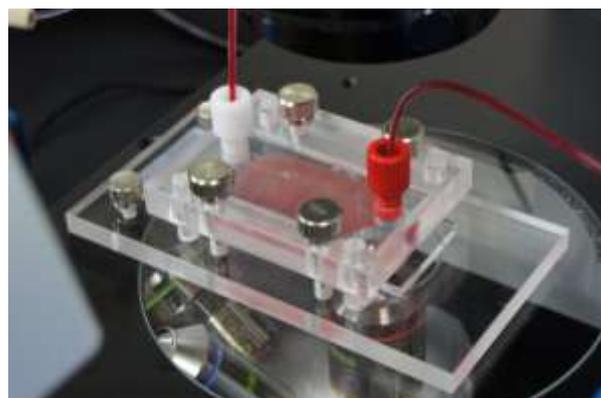
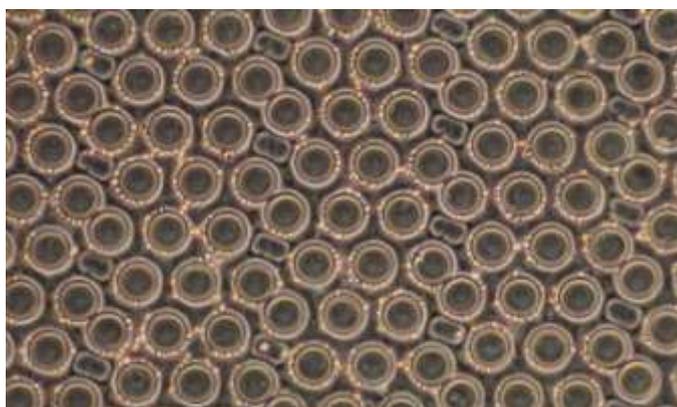
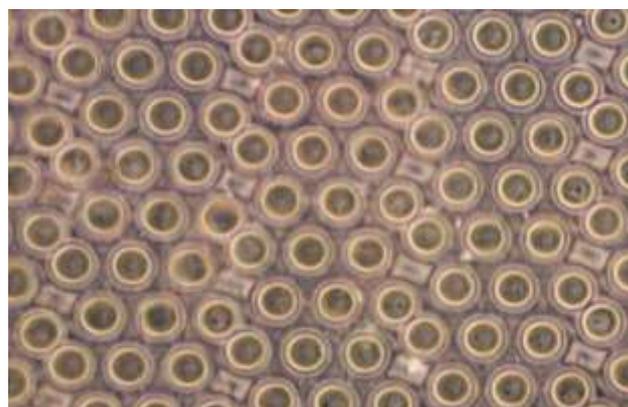


図5 健常者血液の送液試験



(a)抗 EpCAM 固定



(b)抗体なし

図4 癌細胞懸濁液送液後の CTC チップ拡大像

癌細胞捕捉用の抗体として抗 EpCAM 抗体を固定化した CTC チップを用い、チップシステムにより癌細胞捕捉試験を行った。癌細胞は食道癌の細胞株である KYSE220 (嶋田先生所有) を用いた。濃度 40 万個/ml の細胞懸濁液を用意し、流量 1ml/h で約 1.5ml 送液した後のチップを観察した結果を図 4 に示す。抗体を固定した場合にはマイクロポストの周囲に多数の細胞が捕捉される (図 4 a) のに対し、抗体がない場合には細胞がほとんど認められなかった (図 4 b)。このように抗体とマイクロ構造を組み合わせた CTC チップにより癌細胞が捕捉できることが確認できたので、現在、抗体固定化方法やチップ構造の面から、捕捉の効率化検討を継続している。

CTC チップの血液に対する適合性を評価するために、健常者の血液を用いた送液試験を行っている (図 5 参照)。これまでの結果から、CTC チップには血液成分の付着は

少ないが、チップ構造によっては付着物が蓄積してしまう場合があるので、現在、血液の抗凝固処理やマイクロ構造の面から改良を行っている。

4. おわりに

本研究では上記検討の後に、健常者血液/癌細胞株混合系での細胞捕捉試験を経て、患者血液を用いた臨床テスト (富山大学倫理委員会の承認取得済み) を予定しており、早期の実用化を目指している。

「参考文献」

- 1) J.Kaganoi, Y.Shimada et al.:
British Journal of Surgery **91**(2004)1055
- 2) S.Nagrath et al.:
Nature **450**(2007)1235