

循環腫瘍細胞を捕捉するマイクロ流体チップの高効率化と捕捉細胞解析法の研究

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

富山大学大学院医学薬学研究部 長田拓哉 塚田一博 京都大学大学院薬学研究科 嶋田裕

1. 緒言

循環腫瘍細胞（CTC）は癌の原発巣から離れて血液中を流れている癌細胞であり、これを回収することができれば、癌の検査・診断、治療法の選択等に役立てることができる。当センターではこれまで、樹脂を用いた低コストな CTC 捕捉用マイクロチップを作製し、臨床サンプルを用いた実験を行うなど、実用化のための研究を進めている。しかしながら、現状では 1mL の血液から癌細胞を捕捉するために 1 時間かかっており、今後がんの検査・診断で利用するためには、処理の短時間化、ハイスループット化が重要な課題の一つである。

本研究では、血液中を流れる癌細胞をサイズで分離・濃縮し、その後、抗体で捕捉することにより処理時間を大幅に短縮することのできる樹脂製マイクロチップを開発した。

2. 実験方法

チップの作製は、文献¹⁾の構造を参考にして、既報²⁾と同様の方法により行った。また、マイクロチップにフタをして送液チューブ等を接続するためのチップホルダを作製した。

癌細胞として、食道がん由来細胞株である KYSE510 を用いた。培養した癌細胞をトリプシン処理により回収した後、フルオレセインにより蛍光標識し、血液またはバッファーに懸濁させた。試料はシリンジポンプにより流速 100 μ L/min で送液した。癌細胞の流れの撮影は、露光時間を 0.5 秒として蛍光の軌跡を撮影した。癌細胞のチップ上での捕捉は、抗体捕捉部に EpCAM に対する抗体を固定化することにより行った。細胞数とビーズ数は血球計算盤を用いて計測した。

3. 実験結果および考察

作製したチップの外観および構造を図 1 に示す。このチップはサイズによってソートする部分の後に、抗体によって捕捉する部分を設けてある。Inlet1 から癌細胞を混入させた血液を、Inlet2 からはバッファーのみを導入する。血液はチップの上側を流れ Outlet1 から排出される。癌細胞はチップの下側にシフトしていき、抗体捕捉部へと導入される。

サイズソート部の終わり部分での血液の流れ、細胞の流れを図 2 に示す。血液は、層流となって上側を流れている（図 2 上）のに対し、癌細胞は一番下を流れている（図 2 下）のが分かる。このことから、このチップにより血液と癌細胞とが分離できることが分かった。

サイズソート部の終わりで、流路は 14 本に仕切られ、その内 2 本が抗体捕捉部へ流入し、残り 12 本は排出される構造になっている。これにより癌細胞は濃縮されて抗

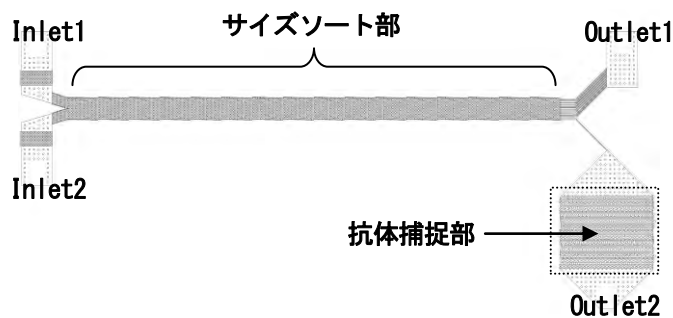
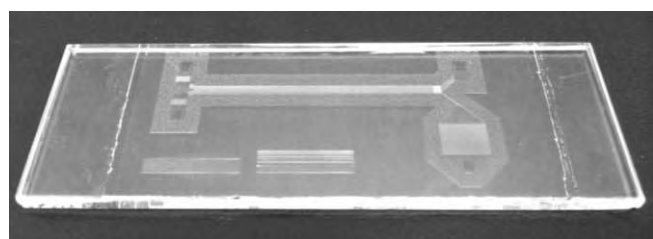


図 1 チップの外観および構造

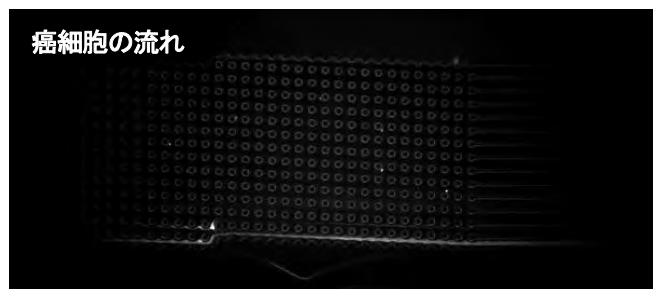
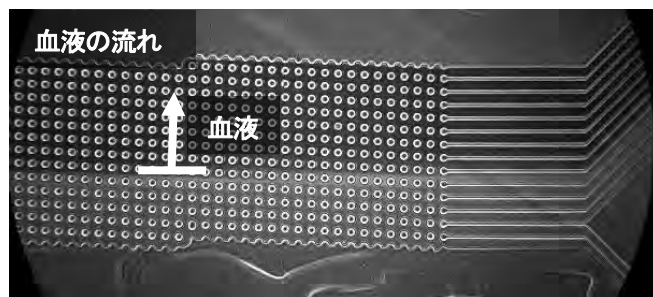


図 2 血液の流れと癌細胞の流れ

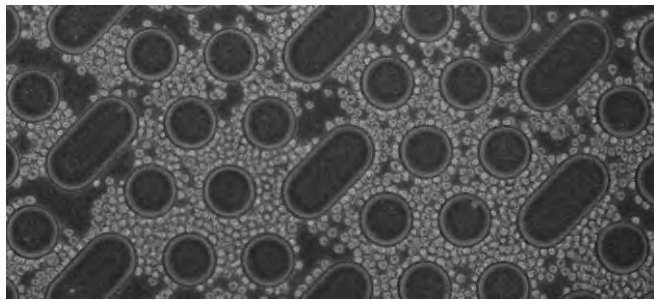


図3 抗体捕捉部で捕捉された癌細胞

体捕捉部へ導入され、抗体捕捉部での流速（抗体による捕捉効率に影響する）を抑えたまま、全体の処理速度を上げることが可能となる。従来の抗体捕捉チップは約16.7 μ L/minの流速で流していたが、このチップは100 μ L/minで流すことができ、処理時間を従来の1/6へと大幅に短縮することができる。

また、図3に示すように、抗体捕捉部では癌細胞がEpCAM抗体によって捕捉できることが確認された。ただ、抗体捕捉部が小さい等の理由から未だ捕捉率は十分ではなく、今後改良が必要である。

次に、バッファーに直径3 μ mのビーズと癌細胞とを加えてチップに流し、抗体捕捉部に抗体を付けずに素通りさせて癌細胞がどれだけ回収できるかを測定した。その結果を表1に示す。Outlet1から排出される液を排出液、Outlet2から回収される液を回収液とする。回収液に含まれるビーズの割合は全体の0.1%であるのに対し、細胞の割合は全体の92.6%であり、ビーズのほとんどを除去し、細胞のほとんどを回収できることがわかった。また、細胞を高速で処理した場合には、細胞に対するダメージが懸念されるが、回収した細胞の生死を確認したところ、

表1 排出液と回収液の細胞数及びビーズ数

	排出液	回収液
ビーズ数($\times 10^4$ 個)	1938	2.5
ビーズ数割合(%)	99.9	0.1
細胞数($\times 10^4$ 個)	4.3	54.2
細胞数割合(%)	7.4	92.6
生細胞率(%)	-	92

生細胞率は92%であり、細胞に与えるダメージは少ないことが分かった。

4. 結言

癌細胞をサイズによって分離・濃縮した後、抗体により捕捉するマイクロチップを開発した。癌細胞を分離する実験を行ったところ、癌細胞の92%以上を分離・濃縮して抗体捕捉部へと導入できること、抗体捕捉部で癌細胞を捕捉することができることを確認できた。癌細胞を濃縮してから、抗体によって捕捉することにより、処理時間を大幅に短縮することができた（処理時間は従来の1/6となった）。また、流路幅を広げる等によりさらなる処理時間の短縮も可能である。

今後は、捕捉した細胞を回収する方法の検討、細胞を捕捉（固定化）したまま解析する方法の検討が必要である。

参考文献

- 1) A. Davis J. A. *et al.* PNAS **103**, 14779-14784 (2006)
- 2) 富山県工業技術センター研究報告 **27**, 92-93 (2013)

キーワード：マイクロ流体デバイス、紫外線硬化樹脂、細胞分離、循環腫瘍細胞、癌

Development of Polymeric Microfluidic Devices for Rapid Isolation of Circulating Tumor Cells

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Takuya NAGATA, Kazuhiro TSUKADA (University of Toyama)

Yutaka SHIMADA (Kyoto University)

The method to isolate and analyze rare circulating tumor cells (CTCs) has a potential to be used in cancer diagnosis, study of metastasis, etc. In this study, microfluidic devices which could be used for size-based and immunoaffinity-based cell separation and recovery were developed using new UV curable resin. We carried out separation tests using cancer cell line, and showed that these cells were successfully separated and captured by our microfluidic chips. In comparison with conventional silicon chips, the use of this polymeric chip can drastically reduce the cost of such separation system. Moreover, this chip can reduce the processing time in comparison with the chip in which immunoaffinity is only utilized.