

血中循環腫瘍細胞によるがん個別化治療のための バイオマーカー解析に関する研究

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇、小幡勲
富山大学 長田拓哉、塚田一博 京都大学 嶋田裕

1. 緒言

循環腫瘍細胞 (CTC) は血液中を流れる癌細胞であり、癌の転移の原因とも考えられている。この CTC を回収・解析することができれば、癌の検査・診断や患者一人ひとりに適した個別化治療などに応用することができる。昨年度より本事業の研究の中で、細胞をサイズで分離するマイクロ流体チップを開発してきた。このチップは癌細胞を細胞懸濁液の形で回収できるので、癌細胞の解析（免疫細胞化学、RT-PCR 等を用いたバイオマーカー等の解析）や培養をするのに適している。

本研究では、開発中のサイズ分離用チップにより、血液中の赤血球及び白血球と癌細胞とをサイズで分離し、癌細胞を細胞懸濁液の形で回収する実験を行い、チップの性能評価を行った。

2. 実験

チップは既報¹⁾と同様である。構造を図 1 に示す。細胞は乳がん由来細胞株である MCF-7 及び MDA-MB-231、食道がん由来細胞株である KYSE-510 を用いた。培養した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、PBS で 2 倍希釈した血液に 13000 cells/mL または 1000cells/mL となるように加えたものを試料とした。Inlet1 から試料を、Inlet2 からバッファー（25wt% Glycerol, 0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS）をそれぞれシリンジポンプにより流速 200 μ L/min で送液した。試料中の赤血球や白血球はサイズ分離部の上側の流れ、Outlet1 から排出される（この液を「廃棄液」とする）。試料中の細胞はサイズ分離部で下方向へと移動し、Outlet2 から回収される（この液を「回収液」とする）。

回収液中及び廃棄液中の癌細胞の個数を計測したものを表 1 に示す。3 種類の細胞株を用いた実験を行った結果、MCF-7 の回収率は 99.7%、MDA-MB-231 の回収率は 98.4%、KYSE-510 の回収率は 99.6%であり、こ



図 1 チップの構造

表 1 回収液と排出液の細胞数

細胞株	回収液中の細胞数(割合)	廃棄液中の細胞数(割合)
MCF-7	12350 (99.7%)	36 (0.3%)
MDA-MB-231	1142 (98.4%)	18 (1.6%)
KYSE-510	1090 (99.6%)	4 (0.4%)



図 2 回収液の蛍光像（左）と位相差像（右）

のチップは高い細胞回収率を示すことが分かった。

図 2 に KYSE-510 を用いた実験での回収液の蛍光像と位相差像を示す。蛍光を発する癌細胞の数と蛍光を発しない細胞（主に白血球。白血球は赤血球よりもサイズが大きいので回収液に混入しやすい）の数を数えると、それぞれ 42 個、41 個であり、ここから白血球の混入数を計算すると 1mL 当たり 1000 個程度となる。これは他の研究チームの結果と比べると 10 分の 1 未満であり、このチップは白血球の除去性能が良いことが分かった。

3. 結言

血液中の赤血球及び白血球と癌細胞とを分離し、癌細胞を回収するマイクロ流体チップの性能を評価し、癌細胞を細胞懸濁液の形で高い回収率で回収できること、癌細胞と赤血球及び白血球を分離できることを示した。これにより、今後回収した細胞の解析、臨床サンプルを用いた実験を進めることが可能となった。

参考文献

1)富山県工業技術センター研究報告 29, 92 (2015)

謝辞

本研究は科研費（基盤研究（C）課題番号：26350557）の助成を受けたものであり、ここに謝意を表する。