

令和 5 年 7 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20704

研究課題名(和文) 白血病細胞の紫外光吸収測定および蛍光観察のためのバイオチップ作製とその評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of biochips for measuring ultraviolet light absorption and fluorescence observation of leukemia cells

研究代表者

稲田 シュンコ (Inada, Shunko)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教

研究者番号：90778127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では白血病細胞の紫外光吸収を調査するため、紫外光透過性に優れている新材料のアモルファスフッ素樹脂を母材とし、フェムト秒レーザーを用いて3次元立体構造のバイオチップを作製した。ヒト白血病由来の3種類の細胞を用いて、紫外光吸収を測定した結果、それぞれの細胞に光吸収が異なることが分かった。本バイオチップの開発により、癌細胞がアポトーシス(細胞死)誘導するピーク波長の検出が短時間で可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究では癌細胞の種類によってアポトーシス(細胞死)誘導する紫外波長域が異なることを見出した。しかし、調査に時間が掛かる欠点があり、調査を加速させる新しい手法が必要である。本研究で開発したバイオチップを用いることによって、癌細胞が最も紫外光吸収するピーク波長の検出が可能になった。有効なピーク波長を検出することによって、従来の抗癌剤や放射線治療がもたらす副作用を軽減できるデバイスの開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to investigate the absorption of ultraviolet light by leukemia cells, a biochip with a three-dimensional structure was made using a femtosecond laser in an amorphous fluoroplastic, which is a new material with excellent ultraviolet light transmission.

As a result of measuring ultraviolet light absorption using three types of cells derived from human leukemia, it was found that the light absorption in each cell was different. The development of this biochip has made it possible to detect the peak wavelength at which cancer cells induce apoptosis (cell death) in a short time.

研究分野：電子工学、医療機器の研究開発

キーワード：癌細胞 バイオチップ 紫外発光ダイオード 癌細胞光吸収 光線治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年では白血病による患者の死亡率は世界的に増加を辿っている。日本では、国立がんセンターの実測死亡者数調査によると2014年は男性：4,896人、女性：3,300人の方々が亡くなったと発表している。白血病は血液の癌である。血液細胞には赤血球、血小板、白血球があるのだが、これらの血液細胞は骨髄で生成する過程で癌になる。癌化した細胞（白血病細胞）は骨髄内で増殖し、骨髄を占拠してしまう。そのため、正常な血液細胞が減少し、貧血や免疫系のはたらきの低下、出血傾向、脾臓の肥大などの症状が現れる。白血病は癌化した細胞のタイプから骨髄性およびリンパ性に分けられ、進行のパターンや症状から急性および慢性に分けられる。急性白血病には急性骨髄性白血病（AML：Acute Myeloid Leukemia）、急性リンパ性白血病（ALL：Acute Lymphoblastic Leukemia）がある。一方、慢性白血病には慢性骨髄性白血病（CML：Chronic Myelogenous Leukemia）、慢性リンパ性白血病（CLL：Chronic Lymphocytic Leukemia）がある。現在では白血病の治療方法は化学療法（抗癌剤）および造血幹細胞移植が用いられている。化学療法の場合は抗癌剤の使用により、白血病細胞に加え健全な細胞もダメージを受けて死滅する。この強い作用により食欲不振、粘膜障害、嘔気・嘔吐、便秘や下痢、肝・腎臓機能障害、皮膚障害などの副作用が生じる。患者にとっては精神的および体力的に負担の大きい治療法である。そのため、副作用を抑えるとともに白血病細胞のみを死滅する新たな治療方法が求められる。

本研究では癌細胞を選択的にダメージ与えることができる紫外光に着目した。過去の研究成果では、ピーク波長365、385、405 nm（半値幅：25 nm）のUV-LED（紫外発光ダイオード）を用いて急性リンパ性白血病由来のヒトT細胞株であるJurkat細胞に対して、細胞のアポトーシス（細胞死）およびネクローシス（壊死）の誘導を評価した。その結果、波長365nmの紫外光はアポトーシス80%以上、ネクローシス2%の誘導が認められた。調査を進展するため、癌細胞をアポトーシス誘導する波長365nm以下の高出力UV-LEDが必要だが、市場にはない。最適な波長を発見するには、癌細胞の紫外光吸収測定に関する基礎研究が必要である。本研究では紫外・可視光源および受光デバイスを集積したバイオチップの作製およびその評価を目指す。

2. 研究の目的

上述のように本研究では癌細胞のアポトーシスを有効的に誘導する紫外波長域を明確にすることが大きな目的である。このことを実現できれば、抗癌剤などによる副作用は大幅に軽減でき、新たな治療手段が提案できると思われる。より効率良く調査を進めるため、紫外光源および受光デバイスが集積したバイオチップの作製が必要である。今回提案するバイオチップの主な構造および役割は図1に示すようにバイオチップ内の流路に単一細胞が通過する際、流路壁の片面から波長280nm（紫外発光ダイオード：UV-LED）の紫外光を細胞に照射し、もう片面の流路壁に設けたスリット、回折格子および分光器で紫外光を検出する。この測定により細胞が吸収する波長域を検出する。将来を見据えて、ウェアラブルや体内埋め込み型チップに適用するため、バイオチップの材料は従来の石英ガラスを用いずに、柔軟性・紫外光透過性に優れるCYTOP（アモルファスフッ素樹脂）を用いて作製する。3種類の白血病細胞（急性骨髄性白血病細胞（KG-1a細胞）、急性リンパ性白血病細胞（Jurkat細胞）、慢性骨髄性白血病細胞（KU812細胞））を用いて評価する。

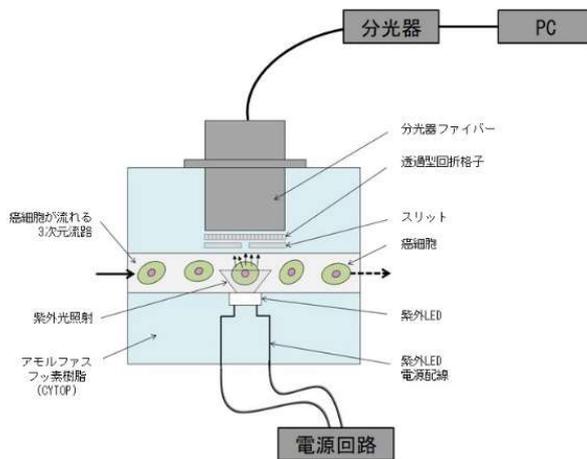


図1：バイオチップの概略図

バイオチップの3次元流路に癌細胞が流れる際、流路壁の片面に集積した波長280nmのUV-LEDで癌細胞を紫外照射する。ここで癌細胞は紫外光を吸収する。流路のもう一つの片面に集積したスリット、透過型回折格子および分光器ファイバーで癌細胞が吸収した紫外光を検出する。

3. 研究の方法

本研究ではアモルファスフッ素樹脂（CYTOP）基板上にフェムト秒レーザを用いて3次元流体構造を形成し、紫外光源および受光デバイスを集積したバイオチップを作製する。本バイオチップを用いて、3種類の白血病細胞に紫外光照射し、細胞の紫外光吸収を測定する。

(1) バイオチップの作製

10mm×10mm（厚さ200μm）のアモルファスフッ素樹脂（CYTOP）基板を3枚作製した。3次元微細加工が可能なフェムト秒レーザを用いて、流路、スリットおよび回折格子を生成した。バイオチップは各基板を回折格子、スリット、流路、フタ（CYTOP基板）を重ね合わせて、アクリル製の枠で固定した。細胞を注入するため、アクリル枠には1000μmの穴をあけ、10μLピペットチップが刺せるようにした。また、紫外光源（UV-LED（280nm））および分光器の光ファイバーを固定して、バイオチップを作製した。

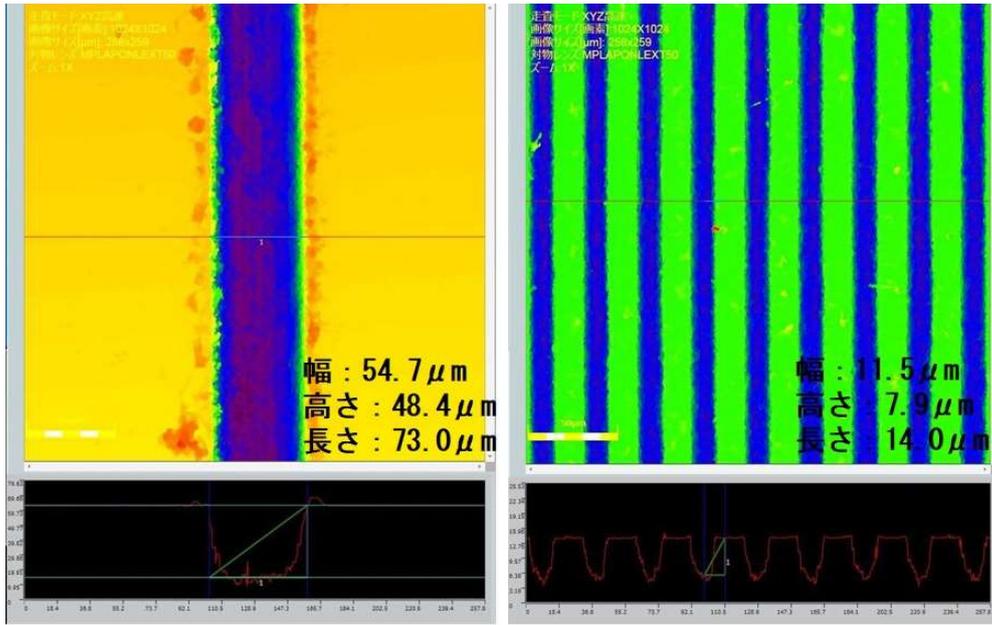
(2) バイオチップの評価

本研究では作製したバイオチップを評価するため、急性骨髄性白血病細胞（KG-1a細胞）、急性リンパ性白血病細胞（Jurkat細胞）、慢性骨髄性白血病細胞（KU812細胞）の3種類のヒト白血病細胞を用いて、紫外光の光吸収を測定した。各細胞はRPMI1640+FBS10%培地を用いて37℃、CO₂ 5%の環境で72時間培養した。細胞濃度を1×10⁵ Cell/mLにし、バイオチップの細胞注入口から細胞を流し、測定を行った。

4. 研究成果

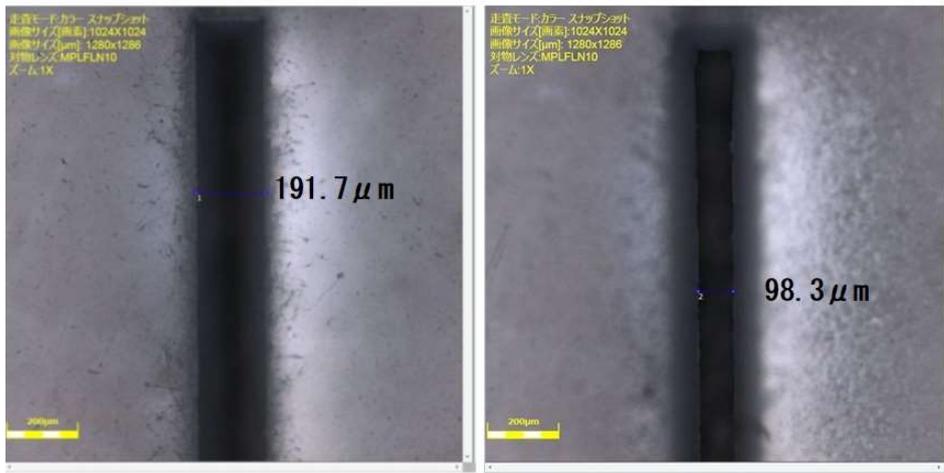
(1) バイオチップの完成

本研究では新材料であるアモルファスフッ素樹脂（CYTOP）を用いて基板を作製し、加工例の実績が少ないフェムト秒レーザで流路（54.7μm×48.4μm×10mm）、スリット（98.3μm×3mm）および回折格子（14.7μm×7.9μm（ピッチ幅：30.9μm）×7mm）の生成に成功した。図2にレーザ顕微鏡の測定結果を示す。これらのCYTOP基板を回折格子、スリット、流路、フタの順で重ね合わせ、紫外光源および分光器の光ファイバーを取り付けてバイオチップが完成した（図3）。



流路

回折格子



光源入射面

光源出射面

スリット

図 2 : フェムト秒レーザーによる CYTOP 基板の加工

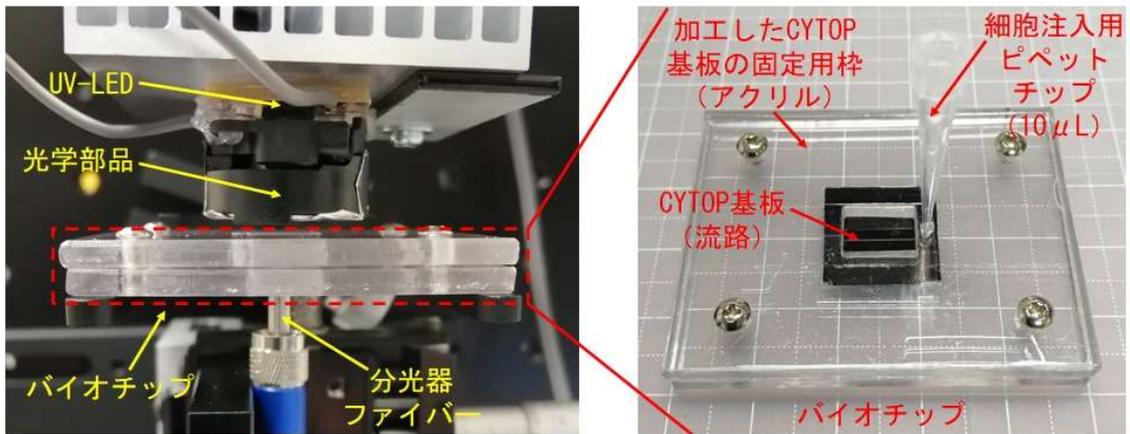


図 3 : バイオチップ

(2) 白血病細胞の紫外光吸収測定

本研究では作製したバイオチップを評価するため、急性骨髄性白血病細胞 (KG-1a 細胞)、急性リンパ性白血病細胞 (Jurkat 細胞)、慢性骨髄性白血病細胞 (KU812 細胞) の3種類のヒト白血病細胞を用いて、紫外光の光吸収を測定した。図4に測定結果を示す。グラフに示されている橙線は流路内に細胞がない状態の測定結果である。これに対して流路内に細胞を流すと、波長のピークの移動は観測されなかったが、細胞の種類によって光強度 (Intensity) が異なっているのを観測することができた。本測定の結果によると入力波長 280nm に対して急性リンパ性白血病細胞 (Jurkat 細胞) に大きな光吸収が起きているのを見出した。このようにして入力波長となる光源を変更すれば、癌細胞がどのピーク波長に光吸収が起きるかを見出すことができる。

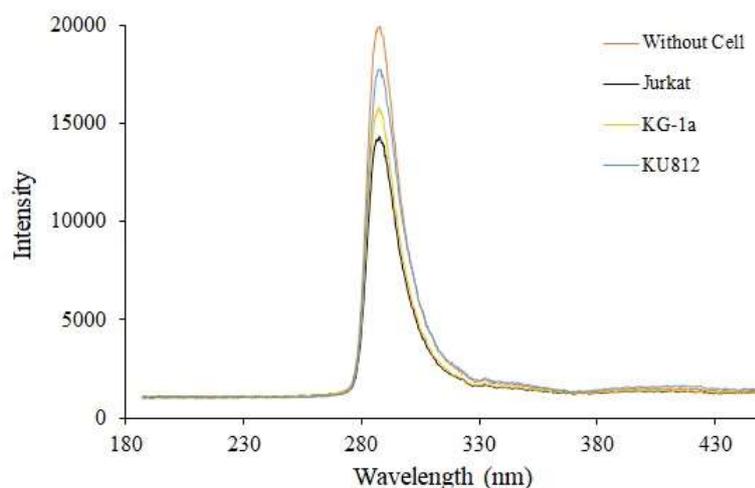


図4：紫外光吸収の測定結果

5. 主な成果発表

本研究は特許出願を目指すため、論文および学会での成果発表は特許出願後に実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------