

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390264

研究課題名（和文） 電界非接触攪拌技術を応用して血中浮遊癌細胞を捕獲する技術の開発

研究課題名（英文） Development of New technology to Capture Circulating Tumor Cells Using an AC Electric Field

研究代表者

小川 純一（OGAWA JUN-ICHI）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20112774

研究成果の概要（和文）：血中浮遊癌細胞捕獲が様々な方法で検討されてきた。しかし得られる癌細胞の純度が低く、診断や治療方針決定に応用できなかった。この研究は血液から純度の高い癌細胞を得る技術開発を目的とした。我々が開発した電界非接触攪拌技術を用いて癌細胞の回収率を検討した。結果はあまりよくなかった。電界の攪拌が均一でないことが原因であった。均一化するために撥水リングを試作した。これにより攪拌が均一化した。研究期間は終了したが、これを用いて研究をさらに継続する。

研究成果の概要（英文）：Cancer cell capture in the blood has been studied in many ways. However, the purity of the cancer cells to be obtained is low and could not be applied in the decision of treatment and diagnosis. This study aimed to develop technologies to get the cancer cells with high purity from the blood. We investigated the recovery rate of cancer cells using an electric field non-contact stirring technique we have developed. However, it was not very good results. This technique was not able to stir the small amount of liquid uniformly. To solve this, we developed a water repellent ring to uniform the stirring. Stirring has become uniform using this ring. Study period was ended, but is continued further studied using this.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：①肺癌 ②血中癌細胞 ③EpCAM ④電界

1. 研究開始当初の背景

血中浮遊癌細胞は癌の治療効果や予後のマ

ーカーとして研究されてきた。その検出方法として cytokeratin の mRNA をターゲットと

した RT-PCR や、Flowcytometry が用いられてきた。しかし RT-PCR はマーカーにはなるが、癌の確定診断には不適切である。一方、Flowcytometry は白血球、赤血球の contamination が起こり、得られる血中浮遊癌細胞の純度に問題があった。もし血中浮遊癌細胞を純度高く捕獲する技術が開発されれば、採血で癌の診断と、治療方針決定を行うことが可能になる。以上を目的として最近、密度勾配遠心法や抗体を固定化したマグネットビーズを用いて血中浮遊癌細胞を捕獲する技術の研究が行われている。しかし残念ながら、他の細胞の contamination を減らすことはできず、満足の行く結果は得られていない。2007 年に Nagrath 等はシリコンチップ（を用いた特殊なシステムを開発して、癌患者から約 50% の純度で血中浮遊癌細胞を捕獲することに成功して *Nature* 誌に発表した。検出した血中の血中浮遊癌細胞は 5 - 1,281 個/mL（白血球の約 100 万分の 1 のレベルを検出）であった。しかしシステムが複雑な上に時間がかかり、研究室レベルでは可能だが、臨床に用いることは難しい。②電界非接触攪拌技術（以下電界技術）：研究協力者の秋田県産業技術総合研究センターの赤上は電界を印加して水分子を共振させる電界技術を開発して、遺伝子のハイブリダイゼーションの効率を上げることに成功した。電界技術の詳細は次頁に示した

2. 研究の目的

本研究で血中浮遊癌細胞の捕獲に応用する電界技術は、研究協力者の赤上が独自に開発した。電界技術は静置した液を電極で挟んで低周波電界を印加し、水分子そのものを共振させることにより、接触せずに液を攪拌する技術である。大量の液の攪拌が可能であること。被攪拌液の上下や外周から内周に向かう

内容物の攪拌挙動が見られるため、均一な攪拌作用が得られることである。また同じ血中浮遊癌細胞が繰り返し抗体付近を通過することも有利な点である。電界技術を用いた本法は Nagrath 等のポンプによる一方向の flow を用いた方法と比較して格段に抗体と血中浮遊癌細胞の表面抗原の接触頻度が増加する。そのため、本法を用いることで短時間に純度の高い血中浮遊癌細胞を捕獲できると期待される。この技術が実際に抗原抗体反応に応用可能か検討するために ELISA 法（ミルク抗原と抗体）で試みた。静置した場合 30 分かかる抗原抗体反応が、電界技術を応用することにより 10 秒で反応が確認された。これは電界技術により抗原抗体反応が格段に促進されたことを表す。同様の報告は現在まで国内外を問わず、認められない。本研究で、血中浮遊癌細胞を純度高く捕獲する技術が開発され、臨床応用されれば、採血で癌の診断を行うことが可能になる。Nagrath 等は早期癌でも血中浮遊癌細胞が検出されたと報告しており、癌の検診にも応用可能である。また血中浮遊癌細胞は癌の進行度や抗癌剤の治療効果判定にも利用できると報告されている。さらに肺癌患者で血中浮遊癌細胞を捕獲できれば採血で EGFR の mutation も検索可能になり、分子標的治療の適応にも利用可能である。以上のように、本法で血中浮遊癌細胞を純度高く、簡便に捕獲可能になれば非侵襲的な採血と簡単な操作で、癌の診断から治療方針決定、治療効果判定が行えるようになると期待される。本法の特許を取得できれば、広く世界中で普及すると思われ、科学技術立国日本の経済活性化にも貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1) EpCAM 発現細胞の選択

Western blot により EpCAM 発現細胞を選択した。

(2) 電界を用いた肺癌細胞回収率の検討

蛍光色素で標識した EpCAM 発現肺癌細胞株 10000 個をヒト血液に浮遊させた。そして抗 EpCAM 抗体を付着した磁性ビーズに添加した。電界を印可した場合と静置したときの癌細胞の回収率を検討した。

(3) 撥水リングの開発.

実験 (2) で電界を印可しても癌細胞の回収率が向上しないことが明らかになり、原因を検討した結果、撥水円をダコペンで手書きしていたために不均一であったことが原因であることが明らかになった。そのため撥水円を均一化するよう PTFE で図 1 のような撥水リ

はっ水リングの開発

はっ水リングの目的

液滴形状のばらつきを抑制し、液滴の高さを一定にする

開発したはっ水リング



内径: 20mm
材質: PTFEテープ (耐薬品性)
(商品名: ニトフロンテープ 日東電工(株) No.903-T)
厚さ: 0.23mm

ングを作成することとした。

図 1. 撥水リングの開発

(4) 撥水リングの有効性の検討

撥水リングを用いたときの接触核を測定した。そしてダコペンで手書きした撥水円と比較した。

(5) 電極間距離の検討

電界を印可する際の適切な電極間距離をレーザー変位計により検討した。

(6) 電界印可時の攪拌効果

電界印可時の攪拌効果を液滴に浮遊させた炭酸カルシウム粒子の挙動をハイスピードカメラで撮影してその動きを計算し、印可する電界強度を変えて比較検討した (図 2)。

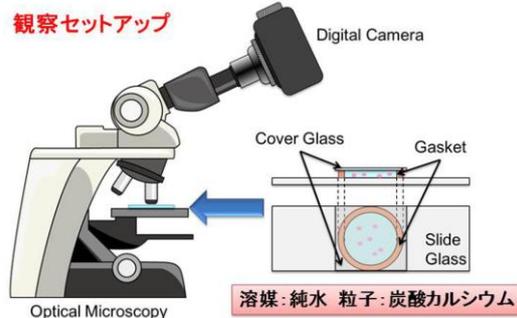


図 2. ハイスピードカメラによる電界攪拌効果の検討

4. 研究成果

(1) EpCAM 発現細胞の選択

培養肺癌細胞を用いて EpCAM の発現を検討したその結果 5 種類中 4 種類で発現していることが明らかになった (図 3)。EpCAM を発現している肺癌細胞株を以後の実験に用いた。



図 3. 肺癌培養細胞株における EpCAM の発現

(2) 電界を用いた肺癌細胞回収率の検討

肺癌細胞株の回収率に及ぼす電界効果の検討を行った。残念ながら図 4 のとおり静置した場合と差がなかった。

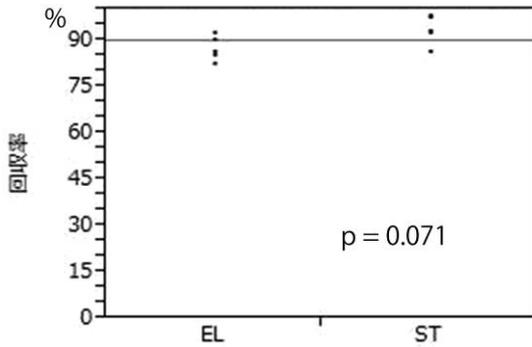


図4. 癌細胞の回収率の検討

(3) 撥水リングの開発

ダコペンで描いた撥水円が均一でないことが、細胞の回収率で電界印可の結果が得られなかったと考え、撥水円を均一化するために撥水リングを開発することとした。様々な材質を用いて検討した結果、内径 20 mm、厚さ 0.23 mm の PTFE テープが最も適切であることがわかった。

(4) 撥水リングの有効性の検討

撥水リングの有効性を検討するためにリング内に液を滴下した時の接触角を測定した。その結果、撥水リングを用いると液の量に対して接触角のバラつきが小さく、安定していることが明らかになった。内径 20 mm の撥水リングでは液量 400 μ L が最適であることも明らかになった。

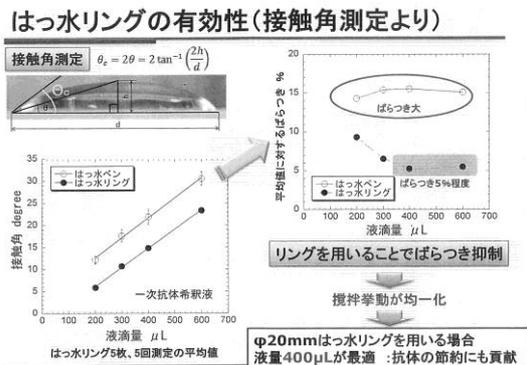


図5. 撥水リングを用いた時の接触角の測定

(5) 電極間距離の検討

内径 20 mm の撥水リングに 400 μ L の液を添加した時の最適な電極間距離を検討した。その結果、 5.4 ± 0.1 mm であることが明らかになった (図6)。

液滴高さ測定による電極間距離の検討

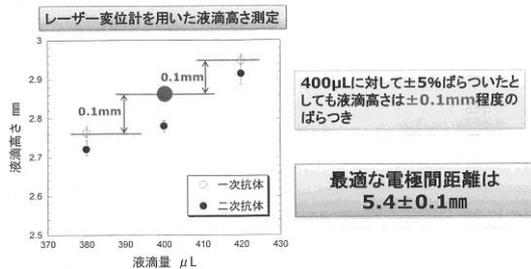


図6. 最適な電極間距離

(6) 電界印可時の撹拌効果

内径 20 mm、厚さ 0.23 mm、液量 400 μ L、電極間距離 5.4 mm の時の撹拌効果をハイスピードカメラで撮影して検討した。その結果静置と比較して 1200 倍の撹拌効果が得られることが明らかになった (図7)。

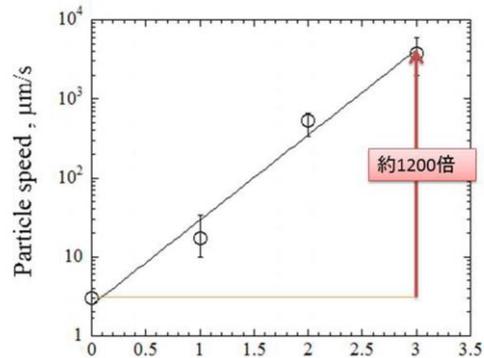


図7. 電界印可時の撹拌効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Toda H, Minamiya Y, Kagaya M, Nanjo H, Akagami Y, Saito H, Ito M, Konno H, Motoyama S, Ogawa J. A novel immunohistochemical staining method allows ultrarapid detection of lymph node micrometastases while conserving antibody. Acta Histochem Cytochem. 2011 29;44:133-9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 純一 (OGAWA JUN-ICHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20112774

(2) 研究分担者

南谷 佳弘 (MINAMIYA YOSHIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30239321

(3) 研究協力者

赤上 陽一 (AKAGAMI YO-ICHI)

秋田県産業技術センター・部長

(4) 研究協力者

中村 竜太 (NAKAMURA RYUTA)

秋田県産業技術センター・研究員