

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：33919

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18860

研究課題名(和文)線虫の化学走性による尿中のガン物質有無の検出デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of Cancer Detection Device using Chemotaxis of *C. elegans*

研究代表者

福田 敏男 (Fukuda, Toshio)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70156785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線虫が有する化学走性によるがん検出能力を用い、マイクロ流体チップ内にて高速、高精度でのがん検出を行うことを目的として研究を行った。その結果、マイクロ流体チップ内での化学物質の拡散速度を抑制し、100匹以上の線虫を一つのマイクロ流体チップ内に導入してがん検出検査を実施可能なマイクロ流体チップを設計、作製した。

作製したマイクロ流体チップについては、チップ内に導入しがん検出を行う線虫の移動速度を向上させるために、波型の流路形状を採用し設計した。さらに、線虫が複数回がん検出の判定を行うことができるよう、流路分岐形状を設計した。これにより、実際のがん患者の尿サンプルを用いた実験を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、死因の第一位は悪性新生物(がん)であり、治療においてはいわゆるステージ0や1の早期がんの発見が重要である。このような早期ステージのがんはリンパ節に転移していないため、外科的手術等で除去して治療出来る可能性が高い。しかし、現在用いられているがん腫瘍マーカーでは早期がんを精度よく検出することが困難である。

本研究では、線虫の走化性を用いて早期がんを検出する研究において、検出用デバイスをポータブル化し実際の医療現場で使用するための基礎技術を確認するものであり、社会的な意義は非常に大きい。また、チャンネル形状と線虫の移動速度との相関が明らかになってくるなど、学術的にも有用な成果を得ることができている。

研究成果の概要(英文)：Detection of *C. elegans* chemotaxis which is behavioral response against chemical substance of has been receiving attention because the chemotaxis can be used to detect cancer from patients' urine. In this research, a microfluidic device was developed to achieve detection of chemotaxis using *C. elegans*. The developed microfluidic device has wave-shaped microchannel, and more than 100 *C. elegans* can be introduced into one device to conduct chemotaxis experiments.

Moving velocity of *C. elegans* was increased by the developed wave-shaped microchannels and micro pillars were designed inside microchannels to conduct detection of chemotaxis several times in one microfluidic device. The developed device achieved the detection of chemotaxis using urine from actual cancer patients.

研究分野：マイクロ・ナノ知能ロボティクス

キーワード：がん診断 医療デバイス マイクロ流体チップ MEMS バイオMEMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

平成27年厚生労働省 人口動態統計の年間推計によると、死因の第一位は、悪性新生物（ガン）であり、特に治療においては、いわゆるステージ0や1といわれる早期におけるガンの発見が重要である。このような早期ステージにおけるガンは、リンパ節に転移をしていないため、外科的手術等で除去して治療出来る可能性が高い。しかし、現在用いられているガン腫瘍マーカーでは、このような早期のガンを精度よく検出することが困難である。

線虫は、犬とほぼ同数の嗅覚受容体(約1,500個)を有しており、嗅覚機能に優れており、特定の化学物質を識別し移動する化学走性を有している。一般的に、この化学走性は培養皿状で線虫の移動を確認する方法が用いられている。しかしこの方法では、線虫移動を個別に識別することは出来ず、走性の検出に十分な時間(約1時間)を要し、また化学物質の投与を実時間で制御することが困難である。

2. 研究の目的

本研究では、波状形状のマイクロチャネルを利用することで、個々の線虫に対する化学走性を瞬時(1s/線虫以下)に高精度かつ容易に交換可能な環境下で、線虫が示す化学走性に基づいた移動を検出するデバイスを構築する。そのため、線虫の有効な走性検出装置、特にガン患者の尿に対する走化性検出装置として線虫観測用のポータブルマイクロ流体デバイスの開発を目指す。システム実現のため、まず実用的な要素として線虫が能動的に移動可能なチャネル設計を目指す。このチャネルにより線虫は特定の刺激を受容した際に能動的かつ自由に移動することができる。次に設計したチャネル形状を内包する走性検出デバイスを開発する。チャネル形状を利用したデバイスを設計することで線虫が行動する範囲および方向を限定することが可能となり、走性を検出することができる。続いて線虫の移動速度を向上させるチャネル形状、および逆止弁機能を有するチャネル形状を設計する。これにより線虫がより高速に移動し移動した線虫をトラップし捕縛することでより効率的に走性を検出することができる。さらに線虫の走性をイメージングシステムなしで線虫を検出するセンサを開発する。センサが線虫の移動を検出することで線虫の走性および走性を誘発させた刺激物質の存在を検出することができる。最後にこれらを内包するデバイスを作製しガン患者および健常者の尿、もしくは尿にかわる化学物質に対する走化性を検出し、化学物質や有害物質を検出する高処理スクリーニング系(HTS)デバイスとしての性能・有用性を示す。

3. 研究の方法

本研究で開発するデバイスは、家庭などの医療機関外においても使用可能なマイクロチャネルデバイスある。その機能として、ガン患者の尿とそれに対しての線虫の走化性を検出することによって、どこにおいても、だれが使用しても、手軽にガン検診が行えることを目的としている。そのために達成すべき要求仕様として、以下の4項目を挙げる。

- ① デバイス内で線虫の自立移動が可能であること
- ② デバイス内で線虫の走化性を検出可能な構造を有すること
- ③ 外部機器の使用をせず、デバイス単体での走化性の検出を可能とすること
- ④ 検査の信頼性の保証として、30匹以上の線虫の走化性検出を実現すること

以上の項目を満たすものとして、我々は図1に示すマイクロチャネルデバイスを作製した。この流体デバイスを用い、線虫の走化性を用いたがん検出が可能であるか実験を行った。

4. 研究成果

図1に示したマイクロ流体チップ形状について説明をする。逆Tの字分岐した波状マイクロチャネルに流入ポートと観察ポートが接続され、観察ポートには滴下ポートが接続されている。流入ポートは、線虫を滴下するポートであり、波状マイクロチャネルに向かってテーパ形状となっており、下部には後述する柱が設置されている。これは、線虫のチャネルへの侵入を促すために設計され、ポートの形状を狭めることによって線虫の運動を制限し、チャネル入口まで誘導するというものである。また、下部柱部分は、誘導された線虫がより内部へ侵入しやすくすることを補助するために設計した。観察ポートは、走化性を示し運動した線虫を確保し、実験後計測し結果の判定を行うためのポートである。さらに、左右の観察ポートは滴下ポートと接続されており、滴下ポートは走化性を検出する際、検査用物質を滴下する目的で作成してある。また、チャネルの経路幅、高さに関しては使用する線虫のステージ Yung Adult の線虫の直径がおおよそ70 μm であることを考慮して設計した。

図2に示すように、流入ポート下部と波状形状部中央分岐部には柱を設置した。これは

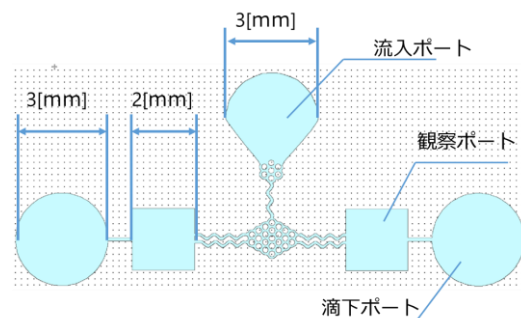


図1 がん検出用の線虫走化性マイクロ流体チップ設計

前述の要求仕様④を達成するために作製した。この柱は $\phi=200\ \mu\text{m}$ であり、中心間距離は $300\ \mu\text{m}$ である。この円柱の設置により、線虫が侵入可能な箇所が増加し、身体下部で柱を押すことで推進力を得られることによる侵入数増加が期待できる。図3に作製したマイクロ流体チップ内に赤色に染色した純水を導入した時の写真を示す。このように、流路全体が繋がっており、全てのポート及びチャンネルが赤く染まっていることが分かる。

線虫を作製したマイクロ流体チップに導入した際の、中央分岐部分の様子を図4に示す。このように、設計の目的である複数の線虫の侵入が確認できた。また、柱の設置とそれに伴う空間の確保により、複数の線虫が侵入した際もチャンネルが詰まることなく、線虫は滑らかにチャンネル内を運動することが可能であった。

図5にチャンネル中央部から観察ポートへと接続する流路における線虫の運動の様子を示す。このように、2本の波状形状部から同時に線虫の頭部が出ていることがわかる。線虫はこの後すぐに、2匹同時に波状形状部から観察ポートへと移動した。このように、観察ポートへと接続する経路を2本にすることによって、1本の場合と比べて指定時間当たりの線虫の走化性判定可能数を増加させることに成功した。また、何らかの事態により一方の波状形状部が詰まってしまった場合においても、もう片方が正常に機能していれば走化性の判定が可能であり、マイクロ流体チップの使用可能範囲を広げることに寄与している。

次に、マイクロ流体チップ内での試薬拡散速度を制御する方法として、増粘剤を用いた手法を検討した。増粘剤を添加することによって、尿などの試験検体に粘性を持たせ、チャンネル内での拡散進行スピードを抑えることで濃度勾配を保持する。今回の実験では、メトロローズを増粘剤として使用し、クリスタルバイオレッドを混ぜたサンプルを流路内に導入することで拡散の様子を観察した。その結果、増粘剤の混合率を増やすことによって、試薬の拡散時間を増加させることに成功した。

線虫の誘引物質を用いて、作製したマイクロ流体チップ内で誘引物質の濃度勾配を作り出し、線虫の走化性を検出可能であるか評価を行った。この実験では、左側の滴下ポートには誘引物質であるブタノンを滴下し、右側の滴下ポートには純水を滴下した。その結果を図6に示す。このように、右側の観察ポートには4匹の線虫が、左側の観察ポートには34匹の線虫が確認された。これは、左側に滴下したブタノンに対して誘引反応を示し、左側に大きく偏向したためと考えられる。同じ実験を複数回繰り返した結果、線虫の移動数、割合にばらつきはあるものの、線虫は誘引物質であるブタノンに対し大きく誘引反応を示し、滴下した側（左側）の観察ポートに多く移動することが傾向として確認できた。

また、線虫の行動特性等における、右側に曲がりやすい、左側に曲がりやすいなどの特性が存在する可能性を考慮し、左右のポートそれぞれに誘引物質を滴下する実験についても複数回を行い、左右の優位性の有無を確認する実験を行った。その結果、線虫の総移動数にばらつきはあったものの、左側、右側に誘引物質を滴下した際の

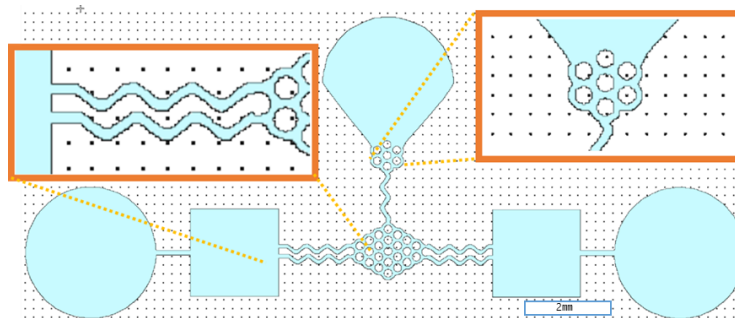


図2 マイクロ流体チップ中央部の柱を有するチャンネル形状

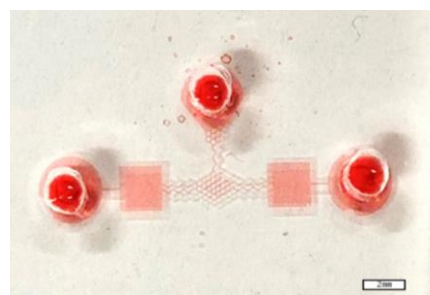


図3 作製したマイクロ流体チップ

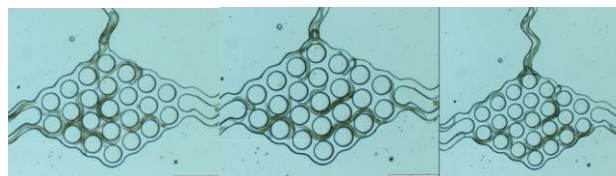


図4 チャンネル中央部の線虫の運動の様子(左から0秒, 2秒, 4秒)

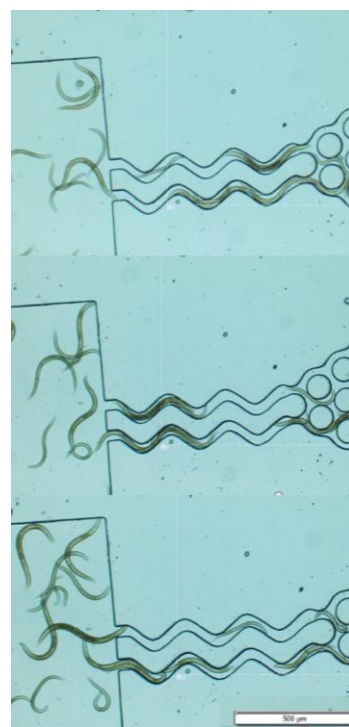


図5 観察ポート接続部における線虫の運動の様子

明確な優位差は認められなかった。この実験結果から、本研究において設計、作製したマイクロ流体デバイスは、化学物質の滴下個所に関係なく、線虫の走化性の検出に用いることが可能であることが示された。

最後に、実際のがん患者及び健常者の尿検体を用いた実験を行った。その結果、健常者の尿検体に対しては線虫は優位な誘因性を示さなかったが、がん患者の尿検体に対しては尿検体側のポートに7割以上の線虫が集まることが確認され、本デバイスを用いた線虫のがん検体への走化性が見られることが確認できた。

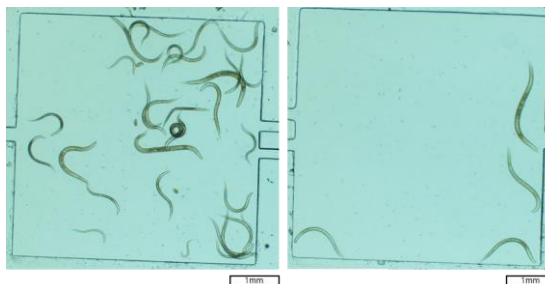


図 6 誘引物質の有無による観察ポート内の線虫数比較 左：誘引物質あり、右：誘引物質なし

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① Satoshi Tomita, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Masaru Takeuchi, Akiyuki Hasegawa, Eun-Hye Kim, Micro Channel Design for Cancer Screening using C.elegans, 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechanics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2018.
- ② 富田智士、竹内大、市川明彦、長谷川明之、金恩恵、福田敏男、線虫を利用した検査用マイクロデバイス設計、第 36 回日本ロボット学会学術講演会、愛知、2018.
- ③ Yuya Baba, Akihiko Ichikawa, Masahiro Nakajima, Naoki Hisamoto, Strahil Pastuhov, Toshio Fukuda, Chemotaxis detection device of C. elegans using capacitance sensor, 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Dec., 2017.
- ④ 馬場雄也、中島正博、市川明彦、福田敏男、線虫の走化性を利用したがん検査デバイス、第 18 回 SICE システムインテグレーション部門講演会 2017、仙台、2017.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：市川 明彦

ローマ字氏名：(ICHIKAWA akihiko)

所属研究機関名：名城大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20377823

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。