

## 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20日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500422

研究課題名（和文） 血液中の微量な腫瘍細胞を捕捉するマイクロチップの高性能化に関する研究

研究課題名（英文） Study on improvement of microfluidic chips for isolation of rare circulating tumor cells in blood.

研究代表者

大永 崇 (OHNAGA TAKASHI)

富山県工業技術センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10416133

研究成果の概要（和文）：血中の微量な腫瘍細胞（CTC）を捕捉できる新たなポリマー製マイクロ流体チップを開発した。チップ表面を機能化することで、腫瘍細胞捕捉率が90%を超える性能を得ることができた。チップのコストや生産性は実用的であり、既に民間会社において従来チップの1/10以下の価格で販売開始した。大学病院にて臨床サンプルによる試験を実施し、CTCの捕捉を確認した。

研究成果の概要（英文）：We developed polymeric microfluidic chips for isolation of rare circulating tumor cells (CTCs) in blood. The chips exhibited capture efficiency more than 90% owing to their specific surface functionality. Cost and productivity of the chip were so practical that the chips have been commercially available at a price less than one tenth of that of the conventional chips. CTCs from patient blood were confirmed to be captured with the chip.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測、腫瘍細胞、マイクロ流体チップ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、末梢血中の微量成分である腫瘍細胞（CTC）が注目されている。CTCは、癌の原発巣から遊離して血管に侵入した腫瘍細胞であり、癌発生の初期段階から存在することが明らかにされている。そしてこのようなCTCからは、原発巣の癌や転移に関わる様々な情報が得られることから、癌の治療、検査、研究などに応用するために、単離・解析できるようにしたいとのニーズが高まっている。し

かし一方で、血中のCTC濃度は極めて低いことが知られており、そのために通常の濃縮・単離方法はここでは利用できない。そこでこれまでに様々な濃縮・単離方法が考案されてきており、その中で少量のサンプルから高い効率でCTCを単離できるマイクロ流体デバイス（CTCチップ）を利用した方法が知られている（S. Nagrath et al. Nature 2007; 450; 1235-1239 参照）。CTCチップは、ミクロな突起を配して比表面積を飛躍的に高めた流路

構造を有し、その表面は腫瘍細胞が持つ特異的なタンパク質（ここでは EpCAM（上皮細胞接着分子）を利用）と選択的に結合する抗体（抗 EpCAM 抗体）でコートされており、数 mL 程度の血液サンプルから 60~80% 程度の回収率で腫瘍細胞を単離する。また、CTC チップにより試験した癌患者の 116 例中 115 例で CTC が捕捉され（健常者では 20 例中 0 例）、単位血液量あたりの CTC 数が抗がん剤治療で変化した腫瘍サイズと関連することなどが示されている。

このように CTC チップは、癌の治療、検査、研究などにおいて非常に有効に使用できることが示されているが、腫瘍細胞回収率から見ると未だ改良の余地が窺えた。CTC チップ性能に大きく影響する因子としては、(A) マイクロ構造、(B) 血液フロー条件、(C) 細胞表面/チップ表面の相互作用、が考えられるが、これまでは A、B を中心に検討が行われてきた。C については、チップが細胞を捕捉する力に直接関わるので回収率への影響が大きいことが推定されるが、これまでは研究例がなく、検討の余地があると考えられた。また既存の CTC チップは実用性の面から考えると、シリコン製であることから価格、物性（脆性、不透明など）の点から課題があると考えられた。事実、現状においても既存 CTC チップは実用化に至っておらず、癌の医療や研究に役立てられるには程遠い状況にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来型の CTC チップを改良することにより、より捕捉性能の高い CTC チップを開発することを目的とする。また本研究では、実用化に耐えうるコストや物性を持った CTC チップとするために、新たなチップ素材や製造方法を利用してチップを開発する。さらに開発したチップを使用して CTC を安全かつ低コストで単離できるシステムを開発し、癌の臨床医や研究者が容易に CTC の単離を行えるようにすることを目的とする。また開発したチップおよびシステムを大学病院に導入し、臨床検体からの CTC 捕捉を実施して、チップ性能等を評価すると共に実用化を目指した改良も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) チップ素材、製造方法

チップは、既に開発済みの光硬化性樹脂をベースとした素材を用い、光硬化プロセスにより製造した。光硬化性樹脂は官能基モノマーを含有しており、得られるチップの表面は官能基により機能化した。

### (2) チップの捕捉性能向上

腫瘍細胞表面/チップ表面の相互作用の面から検討するため、本検討ではチップ表面への抗体固定化方法を変えて検討し

た。チップ表面へ直接抗体を結合する場合は、官能基を利用して抗マウス IgG 抗体を反応させたあと、マウス抗 EpCAM 抗体を固定化した。官能基は、カルボキシル基、エポキシ基、コハク酸イミドエステル構造について検討した。

チップ表面における抗体固定化量を増やすことなどを目的に、表面にグラフトさせたポリマーを介して抗体固定することも試みた。ポリマーはポリアクリル酸、ポリアリルアミンを用い、それらの官能基を用いて上記同様に抗マウス IgG 抗体、マウス抗 EpCAM 抗体を固定化した。

### (3) CTC 単離システム

CTC チップにサンプルを送液できるようにするため、チップホルダーを考案した。チップホルダーによりチップの流入口および流出口にチューブを接続することができるようにし、流入口側チューブをサンプル管に、流出口側チューブをシリンジポンプに各々接続し、ポンプを吸引してチップにサンプルを流せるよう設計した。

### (4) 臨床サンプルテスト

上記 CTC 単離システムを富山大学医学部消化器・腫瘍・総合外科に導入し、癌患者さんから提供されたサンプルによる臨床テストを実施した。テストは、富山大学倫理委員会の承認を得たうえで、患者説明同意文書による患者本人からの文書による同意を得て行った。

本テストでは、CTC 単離システムの操作性等に関する臨床医の意見を聴取し、改良に反映させた。

## 4. 研究成果

### (1) ポリマー製 CTC チップの開発

本研究により開発したポリマー製 CTC チップを図 1 に示す。スライドガラス大の基板の上に、光硬化性樹脂（CTC チップ用に新たに開発）からなる最大幅 20mm、深さ 100 $\mu$ m の流路に 30,000 個を超えるマイクロポスト（円柱形ポストの直径および高さは何れも 100 $\mu$ m）を配列させたチップを開発した。このチップは、透明で倒立型顕微鏡を使用した位相差観察も可能であり、また樹脂の靱性により

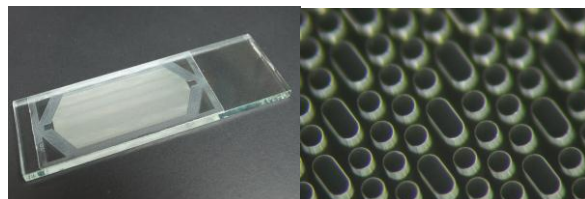


図 1 ポリマー製 CTC チップ

(左：全体像、右：拡大像)

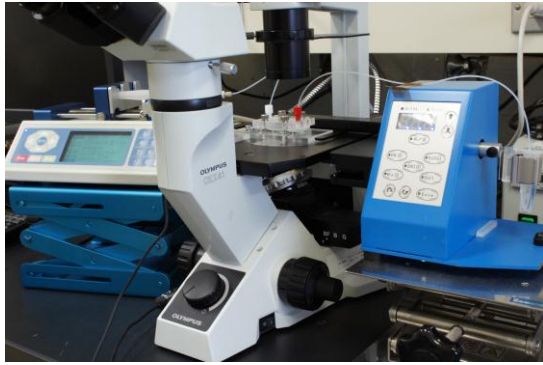


図2 CTC単離システム

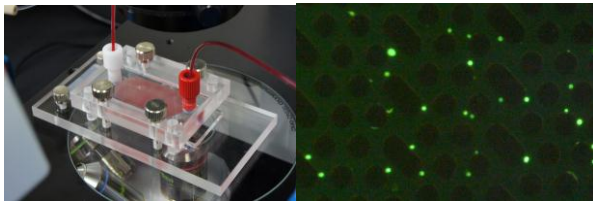


図3 チップホルダー 図4 捕捉された癌細胞  
(蛍光標識細胞を使用)

割れや欠けに強く、チャンネル形成時にカバナーを強く押し当ててもマイクロ構造が破壊されることがない。チップ製造においては硬化時間が3分程度であり、量産化にも対応可能である。また既に製造技術を民間会社に移転し、チップ販売を開始した。チップは現在のところシリコン製CTCチップの1/10以下の価格(数千円/枚)で提供しており、今後の数量拡大、コストダウンによりさらなる低価格化も可能である。

#### (2) CTC単離システムの開発

開発したCTC単離システムおよびチップホルダーを図2および3に、システムによりチップに捕捉された腫瘍細胞を図4示す。このシステムにより、開発したCTCチップに流量コントロールしながらサンプルを流して腫瘍細胞を捕捉し、また送液中の流路内状況や送液後の細胞捕捉状態を観察することが可能となった。

#### (3) CTCチップ性能の向上

種々の官能基やグラフトポリマーによるチップ表面への抗体固定化について検討した結果、エポキシ基による方法が腫瘍細胞捕捉性能、またその再現性に優れることが明らかとなった。そこでエポキシ基のCTCチップを用いて、癌細胞株を用いた捕捉テストを実施した。癌細胞株は、食道癌由来のKYSE150、KYSE220、KYSE510、および乳癌由来のMCF7、SKBR3を使用した。なおKYSEの各細胞株について、フローサイトメーターによりEpCAMに関するMFI (Mean Fluorescence Intensity) を測定したところ、296(KYSE150)、

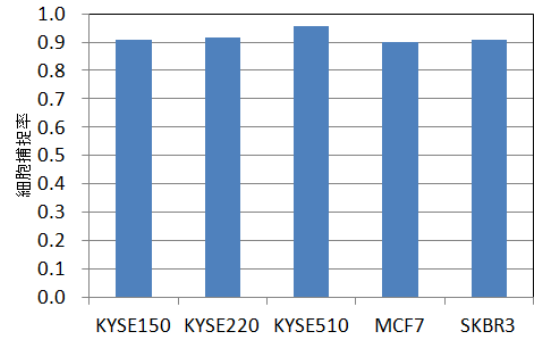


図5 PBS中の腫瘍細胞捕捉率

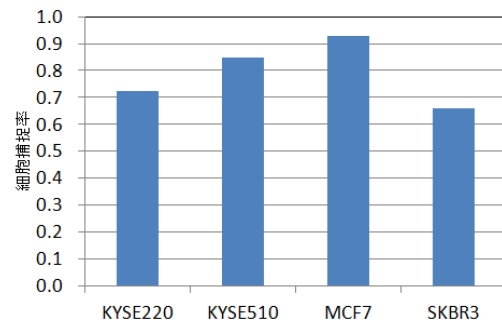


図6 全血中の腫瘍細胞捕捉率

528(KYSE220)、76(KYSE510)であった。各細胞をPBSまたは全血に分散させ、CTCチップの腫瘍細胞捕捉率(チップに捕捉された細胞数/チップに流入した細胞数)を求めた(図5および6参照)。PBS中の捕捉では、本研究の検討範囲においてはEpCAM量、癌のタイプに関わらず、開発したCTCチップは90%を超える高い腫瘍細胞捕捉率を有することが分かった。上記の従来CTCチップの捕捉率(60~80%)はPBS中の測定値であり、これと比較しても本研究のチップは高性能であると言える。一方、全血中の捕捉率は癌細胞株により変化した。値は65%以上で上記文献値を超えていることを考えれば十分とも言えるが、今後変化の原因を解明していけばさらなる性能向上に繋がると思われる。

#### (4) 臨床サンプルテスト

これまでに膵臓癌、胆嚢癌、食道癌、胃癌、乳癌の臨床検体約20例についてCTC捕捉試験を実施した。捕捉細胞をディフ・クイック染色、細胞診により同定したところ、一部検体でCTCの捕捉を確認した。しかし本研究の範囲ではCTCのカウントや解析までには到達できなかった。一方、そのためのサンプル前処理や細胞同定方法などに関する、臨床検体使用に必要な様々な知見を得た。

#### 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 大永崇、嶋田裕、森山亮仁、岸裕幸、小幡勤、高田耕児、奥村知之、長田拓哉、村口篤、塚田一博、Biomedical Microdevices、査読有、DOI: 10.1007/s10544-013-9775-7

〔学会発表〕（計6件）

- ① 大永崇、嶋田裕ほか、細胞表面マーカーがCTC単離用ポリマーマイクロ流体デバイスの捕捉効率に及ぼす影響、第72回日本癌学会学術総会 2013.10.3
- ② 森山亮仁、嶋田裕ほか、安価で簡便なデバイスシステムによる circulating tumor cells (CTC) 検出の試み、第113回日本外科学会定期学術集会 2013.4.13
- ③ 大永崇、嶋田裕ほか、循環腫瘍細胞を単離するためのポリマーマイクロ流体デバイスによる癌細胞株の効率的捕捉、第71回日本癌学会学術総会 2012.9.20
- ④ Yutaka Shimada, Takashi Ohnaga, et al., New micro-fluidic devices with polymeric materials for isolation of circulating tumor cells. The 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2012.4.2
- ⑤ Takashi Ohnaga, Tsutomu Obata, Hiroyuki Kishi, Yutaka Shimada, Kazuhiro Tsukada, Micro-Fluidic Devices Advanced with Polymeric Materials for Isolation of Circulating Tumor Cells. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer 2011.9.22
- ⑥ 大永崇、細胞スクリーニングのための微細構造を有するポリマーマイクロチップ、第29回日本ヒト細胞学会学術集会、2011.8.20

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：血液中の浮遊癌細胞を捕捉できるマイクロチップ

発明者：大永崇、小幡勤、高田耕児、村口篤、岸裕幸、嶋田裕、塚田一博

権利者：富山県、富山大学

種類：特許

番号：特願 2011-164897

出願年月日：2011年7月28日

国内外の別：国内

名称：マイクロリアクタ

発明者：大永崇

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2011-055871

出願年月日：2011年3月14日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.itc.pref.toyama.jp/research/report/2011/r2011\\_2\\_019.pdf](http://www.itc.pref.toyama.jp/research/report/2011/r2011_2_019.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大永 崇 (OHNAGA TAKASHI)

富山県工業技術センター・中央研究所・研究員

研究者番号：10416133

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：30216072

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：60186210

小幡 勤 (OBATA TSUTOMU)

富山県工業技術センター・中央研究所・研究員

研究者番号：30416143