

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630062

研究課題名(和文)個別化医療実現のための細胞内RNA・タンパク質の高品位高速乾燥固定法の開発

研究課題名(英文)Method for rapid-dry fixation of RNA and protein for individualized medicine

## 研究代表者

白樫 了(Shirakashi, Ryo)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：80292754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請研究では、体外に抽出した検体中の細胞に由来する劣化しやすい生体分子を、長期保存後も検査に耐えうる品質をもつ検体試料を作る技術を開発することを目的として、検体を採取後に瞬時に固定する方法の開発をおこなった。その結果、試料濃度と液膜厚さを適切に選定すれば、試料全体がガラス化することがわかった。これは、液性検体である血液の特に血漿を手軽に常温で急速に固定できることを意味しており、当初の目的である急速乾燥固定技術の手がかりを得たと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, the method for fixing liquid clinical analytes containing biomolecules, which degrade in a very short time, was developed. The method might be useful for providing high quality analytes for biopsy even after the longtime of storage. The developed method allows rapid fixation of whole liquid analytes containing dry-protective agents, such as blood, especially plasma.

研究分野：熱工学

キーワード：生体保存 高速乾燥 ガラス化 臨床検体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、血中で高々数 10 個/mL の確率で存在する血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell, 以下 CTC)を分離することが出来るようになったことで、がん医療における早期発見が可能になりつつある。一方で、個体差のある腫瘍細胞を効果的に死滅させるためには、テラメイト<sup>®</sup>の抗がん剤が有効であり、そのためには患者の腫瘍細胞で発現している遺伝子の情報を核酸(特に RNA)やバ<sup>®</sup>イマ<sup>®</sup>ーカーである標的分子(タンパク質)より取得することが不可欠である。最近では DNA や RNA 等の核酸を増幅する技術や高速化したシーケンサの普及により、通常の血液検査で血中に存在する種々の遺伝子の情報が比較的簡便に得られる状況になりつつあるため、採血->CTC 分離->タンパク質の同定や発現している遺伝子の解読、によるテラメイト<sup>®</sup>創薬への期待が高まってきている。しかしながら、遺伝子の発現に直接関わる RNA や発現の結果として生成されるタンパク質は極めて劣化が速く、現状では採血後の迅速な検査・測定が必要であるため、検査の精度・個数に限界がある。この劣化の障壁を取り除くべく、簡便且つ高品位な RNA やタンパク質の長期保存法が望まれている。現在、海外の医療器具メーカーより DNA の乾燥保存を目的としたキットが発売されているが、検体検査に耐える RNA やタンパク質の保存については実現されていない。そのため、これまでに種々の疾患の早期発見や進行状態の検出に有効なバ<sup>®</sup>イマ<sup>®</sup>ーカーは 15 万種ほど発見されているが、劣化しやすいため臨床検査では、100 種程度しか実用化されていない<sup>1)</sup>。

研究代表者は、電気操作による細胞膜輸送の研究を行ってきたが、同操作により極めて迅速・非侵襲的に細胞膜を消滅させ細胞内の生体分子を取り出すことが可能であることに着目し、劣化の速い細胞内の RNA やタンパク質を、適切な状態で耐乾燥保護物質(以下、保護物質)と直ちに接触・乾燥させることで、短時間で簡便に固定・保存できる可能性があることに思い至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、血液等の液性検体を念頭において、劣化の速い生体分子(細胞内の核酸や血漿内のタンパク質)を耐乾燥性の生体保護物質と接触させ、短時間の乾燥により固定する簡便な技術を開発することで、常温長期保存にも耐えうる劣化のない高品位の臨床検体を提供することを目指す。

具体的には以下の 2 点の実験をおこなった。

(1) 細胞内の生体分子を、非侵襲的に短時間で取り出す技術:

電気パルスで細胞膜を非侵襲的に瞬時除去

することで、細胞内に存在する RNA や種々の生体分子を、細胞周囲の耐乾燥保護物質と接触させて短時間で乾燥・固定するプロセスを提案し、電気的操作に必要なパラメータを調べた。

(2) 乾燥過程における生体保護物質水溶液内の物質輸送の可視化と濃度分布の測定:

生体分子を含む生体保護物質水溶液は、乾燥過程で気液界面から水分が蒸発して、液相がある濃度に達すると溶質の結晶析出や、ガラス化がおきる。従って、乾燥条件によっては部分的なガラス化しかおきないため、乾燥過程における水溶液内の物質輸送を可視化して、適切な乾燥条件の選定に必要な知見を得た。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞内の生体分子を、非侵襲的に短時間で取り出す技術:

図 1 に示すような底部に電極間隔 20 $\mu$ m の微細金電極がパターンニングされた 16 穴のウェル (E-Plate16, ACEA Biosciences) の中に 300mM ソルビトール水溶液に細胞密度 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>cells/mL の T リンパ球(Jurkat)を懸濁させた試料を 50 $\mu$ L 入れて、電極間に 8MHz の交流を印加して誘電電気泳動により細胞を電極間に並べた後に種々の強度と時間の電場を印加することで、細胞膜を破壊させた。その後、試料を回収して細胞数密度を粒子計測計で測定することで破砕率を計算した。

次に、ウェル内に 20 $\mu$ L の溶質濃度 30wt% の生体保護物質水溶液(デキストラン;Mw150kDa/トレハロース=3:1 質量比)を種々の濃度で滴下して真空乾燥させることで表面を生体保護物質で被覆した電極を準備した後、同様の実験を行い保護物質の被覆厚さに対する破砕率の影響を調べた。滴下した水溶液には、蛍光物質(RhodamineB)を極微量予め添加されており、乾燥後に、保護物質と共に残留した電極上の蛍光物質の高さ方向分布を共晶点蛍光顕微鏡で可視化した。保護物質の被膜厚さは、蛍光画像より測定した。

(2) 乾燥過程における生体保護物質水溶液内の物質輸送の可視化と濃度分布の測定:

ポリカーボネイトに 45 $\times$ 1 $\times$ 0.25mm の溝を加工し、その溝内に保護物質が溶けた検体を模擬した試料液として、種々の濃度と混合比の生体保護物質水溶液(デキストラン;Mw150kDa+トレハロース)を入れて、溝の一端を開口したまま PDMS で封止することで 1 方向乾燥を実現する系を構築した(図 2)。この系を 25 $^{\circ}$ C の恒温プレート上で大気開放した際の乾燥過程の経時変化を共晶点蛍光顕微鏡で撮影した。試料液には、トレーサーとして、

RhodamineB が0.01wt%添加してあり、試験液の濃縮度(溶質濃度)と輝度の校正を予め校正しておくことで、乾燥過程における試料液内の濃縮分布の経時変化を観察することができる。

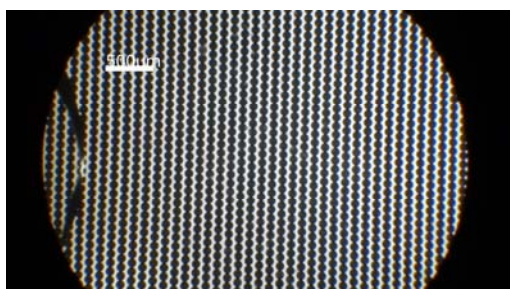


図1 パターン電極(電極間最短距離 20 $\mu$ m)

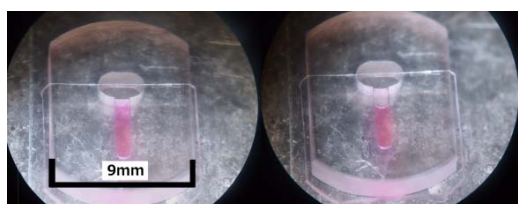


図2 試料封入容器

#### 4. 研究成果

##### (1) 印加電界の強度・時間と細胞膜破砕率

図3に電場印加前後の細胞の顕微鏡写真を、図4に有効電界強度15kV/cm~30kV/cmの電場を細胞懸濁液に印加した時間に対する膜破砕率をプロットしたグラフを示す。図3より電場の印加により細胞膜が消失している様子がわかる。図4に示す20kV/cm以上の電界強度を印加した場合には、電場を1sec以上印加すると、試験液が電気分解をおこし、液中の生体分子を著しく劣化させる可能性がある。また、10~15kV/cmの電界強度においては、印加時間を長くすると破砕率が高くなるが、80%以上の破砕率を得るためには、15kV/cmで100sec以上の電場の印加が必要であることがわかった。

図5に、8MHz-15kV/cm-60secの電場を細胞懸濁液に印加した際における、電極上の保護物質の被覆厚さに対する細胞膜の破砕率を示した。図より、被覆厚さ0でも60 $\mu$ m程度でも細胞破砕率は約80%でほぼ一定であり、保護物質で電極を被覆しても8MHz-15kV/cm-60secの電場で約8割の細胞について細胞内の生体分子を保護物質と接触させることがわかった。

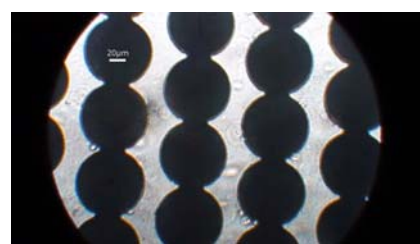
(2) 乾燥過程における生体保護物質水溶液内の物質輸送の可視化と濃度分布の測定：

図6の(1)と(2)に40wt%トレハロース水溶液および40wt%-デキストラン-トレハロース水溶液(溶質質量濃度比2:1)の一方乾燥に伴うトレーサー蛍光物質の濃度分布の時間変化

を典型例として示す。図より、トレハロース水溶液の場合には、気液界面の溶質濃度が極めてたかく、界面から液相側50 $\mu$ mの範囲内で20~25wt%程度の濃度差があり、この範囲に急激な濃度勾配が形成されている。一方、デキ



(1)



(2)

図3 電場印加前(1)直後(2)顕微鏡写真

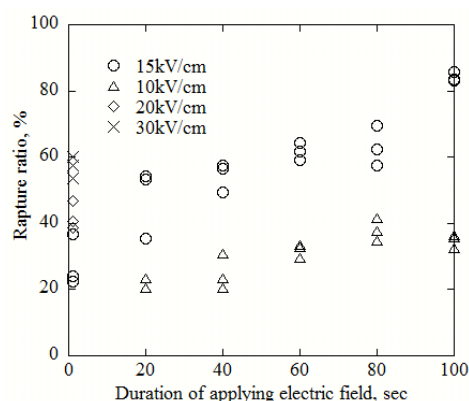


図4 正弦波電場(8MHz)を印加した際の電場印加時間に対する細胞破砕率

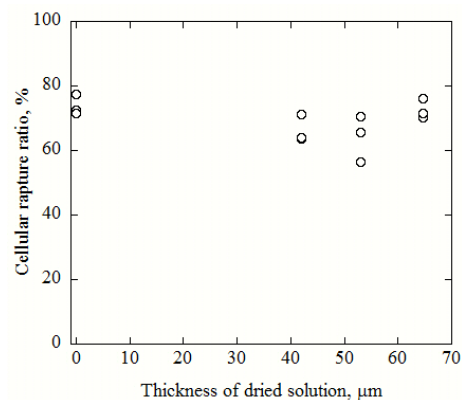
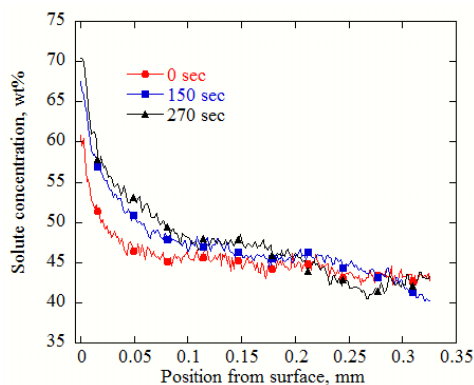
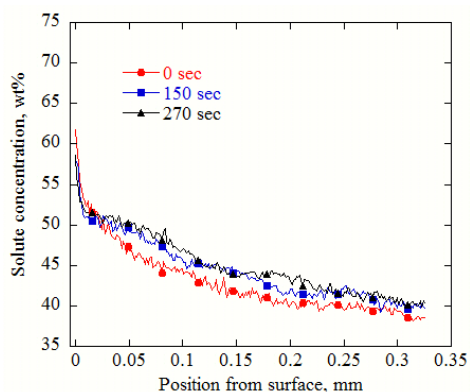


図5 生体保護物質の電極被覆厚さに対する細胞破砕率



(1) 40wt% Trehalose



(2) 40wt% Trehalose:Dextran=1:2

図 6 蒸発界面より液相側の溶質濃度分布(図中の秒数は測定開始からの経過時間)

ストラン-トレハロース水溶液の場合は、気液界面の溶質濃度は 50wt%程度で、極薄い領域に急峻な濃度分布があるものの、界面から液相側 50 $\mu$ m でも高々10wt%程度しか濃度差がなく、液相内はほぼ直線的な濃度分布となっている。いずれの場合も界面近傍の溶質濃度が高くなっている。この界面近傍に限定された場所に高濃度領域が存在する現象は、試料の乾燥速度によっては、乾燥界面の近傍のみがガラス化して内部が液体のままで維持される可能性があることを示唆している。特に、溶質のトレハロース比率が高いと、気液界面の比較的厚い範囲で濃縮が進むので、乾燥に伴い界面にガラスまたは結晶の固相殻が生じ、内部の濃度不均一が助長される傾向がある。

これらの観察結果に基づいて、予備実験的に薄膜化した保護物質水溶液を常温で減圧乾燥したところ、全体が結晶粒界等を生じずに透明に固化(ガラス化)したことから、適切な保護物質濃度と液膜厚さにすることで、短時間で常温ガラス化ができることが示唆された<sup>2)</sup>。

<引用文献>

1) G.Poste,et.al., *Nature*, vol.469, No.13 (2011), pp.156-157.

2) 高野 清, 白樫 了, 研究報告 常温急速乾燥したトレハロース水溶液膜の赤外吸収スペクトルと含水率の測定, 低温生物工学会誌 vol.60, No.2 (2014), 115-118.

## 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 2 件)

① 白樫 了, 細胞・生体分子の保存操作における物理・化学的環境変化とその影響について, *臨床病理* vol.63, No.1 (2015), 102-110. (査読あり)

② 高野 清, 白樫 了, 常温急速乾燥したトレハロース水溶液膜の赤外吸収スペクトルと含水率の測定, *低温生物工学会誌* vol.60, No.2 (2014), 115-118. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

① 高野 清, 白樫 了, 常温急速乾燥したトレハロース水溶液膜の赤外吸収スペクトルと含水率の測定, 第 59 回低温生物工学会セミナー及び年会, 2014.6.29, 九州大学

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 試料保持装置, 試料保持方法及び保持部材

発明者: 白樫 了, 高野 清

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-063958

出願年月日: 2015.03.26

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号: 80292754