

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810082

研究課題名(和文)細胞内元素量情報に基づく血中循環腫瘍細胞(CTC)検出システムの開発

研究課題名(英文)Development of a peripheral blood circulating tumor cell (CTC) detection system based on the information of intracellular elemental contents

研究代表者

宮下 振一(MIYASHITA, Shin-ichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：60614766

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)：がんの早期発見や転移性がんの高効率モニタリングを可能とする、細胞内元素量情報に基づく新たな血中循環腫瘍細胞(CTC)検出システムを開発するための基盤研究として、マイクロ流体デバイスを用いた高効率な細胞分離技術の構築、並びに、一細胞質量分析技術による各種細胞中元素マーカーの高感度分布計測法の確立に取り組んだ。細胞分離用マイクロ流体デバイスを試作検討し、ピンチフローチップデバイスが高効率かつ良好な分離能を有することを実証した。一細胞質量分析の要素技術について検討し、質量分析計への試料導入には細胞直接導入インターフェースが、CTCを識別するための元素マーカーには銅又は亜鉛が有用であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：As a fundamental study to develop a new peripheral blood circulating tumor cell (CTC) detection system based on the information of intracellular elemental contents, a highly efficient cell separation technique using a microfluidic device and a highly sensitive distribution measurement method of specific marker element contents in various types of cells using single-cell mass spectrometry were examined. Different types of microfluidic devices for cell separation were experimentally produced and evaluated, and consequently a pinched flow chip device turned out to have higher efficient and better separation capabilities than others. The component technologies of single-cell mass spectrometry were examined, and it was demonstrated that a direct cell introduction interface is ideal for sample introduction due to its high transport efficiency of cells into the ion source of mass spectrometer, and that copper or zinc is useful as a specific marker element for identifying CTC.

研究分野：化学

キーワード：マイクロ流路分析 がん診断 血球 循環腫瘍細胞 質量分析

1. 研究開始当初の背景

循環腫瘍細胞 (CTC) はがんの転移の原因であり、この転移ががんの主な死亡原因であるため、血中に存在する CTC を高感度かつ高効率に検出する技術が求められている。しかしながら、従来の CTC 検出法は、細胞の大きさや内部構造の異常、又は、がん標的分子・遺伝子を検知する方法であり、コストと時間がかかるという課題がある。

2. 研究の目的

本研究は、がんの早期発見や転移性がんの高感度・高効率モニタリングを可能とする、細胞内元素量情報に基づく新たな血中 CTC 検出システム (図 1) を開発するための基盤研究として、マイクロ流体デバイスを用いたハイスループットな細胞分離技術の構築、並びに、一細胞質量分析技術による各種細胞中元素マーカの高感度分布計測法の確立に取り組むものである。

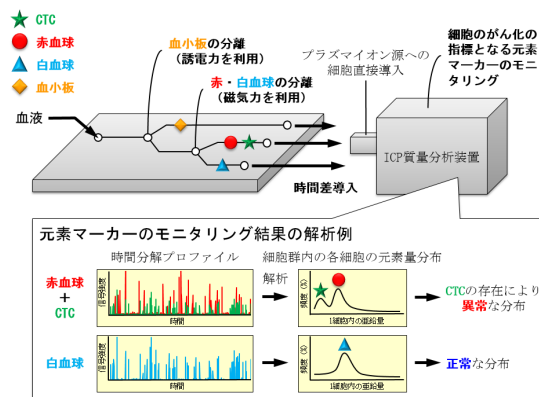


図 1 細胞内元素量情報に基づく新たな血中 CTC 検出システムのイメージ

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスを用いたハイスループットな細胞分離技術の構築、並びに、(2) 一細胞質量分析技術による各種細胞中元素マーカの高感度分布計測法の確立の方法について以下に示す。

(1) 細胞分離用マイクロ流体デバイスの作製

文献調査結果、並びに、密度差に基づく微粒子分離用マイクロチップデバイス (引用文献) を用いた予備的検討結果から最適形状と予想されたピンチフローチップ及びラミナフローチップデバイスを試作し、これらを用いた血球細胞の分離技術の構築に取り組んだ。具体的には、血球細胞を模倣した微粒子を用いて各種試作デバイスの分離性能を評価した。

(2) 元素マーカの高感度分布計測法の確立

所属研究グループが開発を進めてきた、プラズマイオン源への細胞直接導入による一細胞質量分析技術の高度化に取り組んだ。具体的には、これまでの研究 (引用文献) に

より、平均細胞直径 $2.0 \mu\text{m} \sim 3.0 \mu\text{m}$ の細胞については導入効率約 100 % を実証済みの細胞直接導入インターフェース (フローフォーカス型ネブライザー及び全量消費型シースガスプレッチャンバー) について、高効率導入が可能な細胞のサイズ範囲拡張を目的として、より細胞直径の大きい血球細胞及び CTC を想定した微細藻類ユグレナ (平均細胞直径 $17.7 \mu\text{m}$)、並びに、より細胞直径の小さい血球細胞を想定したナノ粒子を用いた導入効率評価を行った。

次に、上記一細胞質量分析技術を用いた各種細胞中元素マーカの高感度分布計測において、血中がん細胞の存在の有無を判断するために有用な元素マーカの探索に取り組んだ。具体的には、正常細胞及び複数種のがん細胞の元素含有量を分析し、両者を比較することにより、含有量が有意に異なる元素を探索した。

4. 研究成果

(1) 細胞分離用マイクロ流体デバイスの作製
血球細胞を模倣した微粒子を用いて試作デバイスの分離性能を評価した結果、ピンチフローチップデバイスにおいてハイスループットかつ良好な分離を達成した。このことから、当該デバイスを用いることにより、実際の血液試料中の血球細胞についても同様の分離が達成できる可能性が高いことが明らかとなった。

(2) 元素マーカの高感度分布計測法の確立
細胞直接導入インターフェースについて、高効率導入が可能な細胞のサイズ範囲拡張を目的として、微細藻類ユグレナを用いた導入効率評価を行った結果、細胞導入効率が著しく低かったほか、安定した一細胞分析が困難であった。一方、ナノ粒子を用いた導入効率評価を行った結果、粒子導入効率は約 100 % であった (図 2)。このことから、平均細胞直径が $3.0 \mu\text{m}$ 以下の広範囲のサイズの細胞については約 100 % の効率で導入可能であることが明らかとなった。

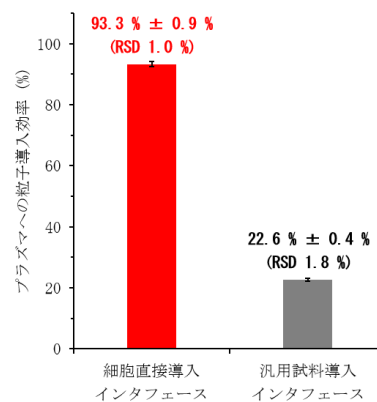


図 2 細胞直接導入インターフェースにおける白金ナノ粒子 (公称粒子径 70 nm) の導入効率評価結果

次に、有用元素マーカーの探索を目的として、正常細胞及び複数種のがん細胞の元素含有量について網羅的に解析した結果、一部のがん細胞における銅又は亜鉛含有量が正常細胞と比較して有意に異なることを確認した。このことから、一細胞質量分析技術による高感度分布計測において、血中がん細胞の存在の有無を判断するための元素マーカーとして銅又は亜鉛の有用性が高いことが明らかとなった。

以上の結果から、細胞分離用マイクロ流体デバイスとしては、ハイスループットかつ良好な分離が可能であったピンチフローチップデバイスが好適と考えられた。一方、一細胞質量分析技術による各種細胞中元素マーカーの高感度分布計測では、平均細胞直径が $3.0\ \mu\text{m}$ 以下の広範囲のサイズの細胞の高効率導入が可能であった細胞直接導入インターフェースの使用が有効と考えられた。また、血中がん細胞を識別するための元素マーカーとしては、正常細胞と一部のがん細胞で元素含有量に有意差が確認された銅又は亜鉛の使用が有効と考えられた。今後は、上記細胞分離用デバイス及び高感度分布計測法を融合した血中 CTC 検出システムのプロトタイプを構築し、実証試験を進める予定である。

<引用文献>

杉山 大輔、手島 裕貴、山中 賢一、永田 Maria Portia、真栄城 正寿、山下 健一、高橋 昌志、宮崎 真佐也、Simple density-based particle separation in a microfluidic chip、Analytical Methods、Vol. 6、2014、pp. 308 - 311
宮下 振一、Alexander S. Groombridge、藤井 紳一郎、蓑田 歩、高津 章子、日置 昭治、千葉 光一、稲垣 和三、Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry、Journal of Analytical Atomic Spectrometry、Vol. 29、2014、pp. 1598 - 1606

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4件)

宮下 振一、藤井 紳一郎、稲垣 和三、高効率試料導入システムを用いた高時間分解 ICP-MS による単一ナノ粒子・細胞分析、分析化学、査読有、印刷中、2017
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bunsekikagaku/-char/ja/>
稲垣 和三、宮下 振一、藤井 紳一郎、藤本 俊幸、シングルパーティクル ICP-MS: ナノ粒子分析法としての

time-resolved ICP-MS、ぶんせき、査読無、2017 巻、2017、pp. 105 - 111

<http://www.jsac.or.jp/bunseki/bunmokuji.html>

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、高津 章子、稲垣 和三、藤本 俊幸、High transport efficiency of nanoparticles through a total-consumption sample introduction system and its beneficial application for particle size evaluation in single-particle ICP-MS、Analytical and Bioanalytical Chemistry、査読有、Vol. 409、2016、pp. 1531 - 1545

DOI : 10.1007/s00216-016-0089-5

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、日置 昭治、高津 章子、藤本 俊幸、稲垣 和三、シングルパーティクル ICP-MS におけるナノ粒子のプラズマ導入効率の評価、日本分析化学会第 64 年会「展望とトピックス」、査読無、2015、p. 20

http://www.jsac.jp/sites/default/files/64nenkai_topics.pdf

[学会発表](計5件)

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、安保 充、高津 章子、稲垣 和三、Characterization of nanoparticles uptake and adsorption by red microalgal cells using single particle ICP-MS、2017 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry、2017 年 2 月 23 日、サンクトアントン・アールベルク(オーストリア)

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、安保 充、高津 章子、稲垣 和三、時間分解 ICP-MS を用いた微細藻類と金属ナノ粒子の相互作用解析、日本分析化学会第 65 年会、2016 年 9 月 14 日、北海道大学(北海道・札幌市)

宮下 振一、藤井 紳一郎、稲垣 和三、High performance concentric nebulizer for ICP-MS: It's application for single-cells and nanoparticle analysis、2016 Korean Society for Mass Spectrometry Summer Conference、2016 年 8 月 19 日、慶州(韓国)

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、高津 章子、稲垣 和三、Evaluation of transport efficiency of nanoparticles through a total consumption sample introduction system in single particle ICP-MS、2016 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry、2016 年 1 月 11 日、ツーソン(アメリカ)

宮下 振一、三橋 弘明、藤井 紳一郎、日置 昭治、高津 章子、藤本 俊幸、稲垣 和三、シングルパーティクル ICP-MS におけるナノ粒子のプラズマ導入

効率の評価、日本分析化学会第 64 年会、
2015 年 9 月 9 日、九州大学（福岡県・福岡市）

〔図書〕（計 1 件）

宮下 振一、藤井 紳一郎、重田 香織、
稲垣 和三、Springer、Metallomics -
Recent Analytical Techniques and
Selected Applications -

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮下 振一（MIYASHITA , Shin-ichi）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・物質
計測標準研究部門・主任研究員
研究者番号：60614766