

提出日 2024年7月29日

氏名:栗生 識

所属:生産技術研究所(2部)

学年または身分:助教

研鑽タイトル Research Title

マイクロフィルタを用いた血中循環腫瘍細胞の分離と白血球除去効率の向上に関する研究

渡航先 Visited Institution

ONCOLille (Bd du Professeur Jules Leclercq, 59000 Lille, France)

渡航期間 Traveling Period

2024年6月30日~2024年7月14日

研修概要 Research outline

血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell; CTC)は、がんの進行状況や腫瘍本体の様子を知る上で有望な細胞である。しかし CTC は血液にわずか 10 個未満/mL である一方、CTC と形状などがよく似た白血球は 10⁷ 個/mL 単位で存在する。すなわち臨床において CTC を用いた診断の実現には、希少な CTC を失うことなく回収し、白血球を効率的に除去する技術が求められている。そこで今回の研修では、血中のがん細胞を高収率で回収しつつ、白血球の除去効率を向上させるシステムの実証試験を行った。

研修先について About the laboratory visited

研修は、フランス・リールにあるがん腫瘍研究所 ONCOLille で行った(図 1)。この研究所は、東京大学生産技術研究所の海外ラボである”SMMIL-E”が設置されており、生産技術研究所の研究者が研究する体制が構築されている。



図 1. 研修先の ONCOLille.

今回は、ONCOLille の共同研究者である Chann Lagadec 先生、Mehmet Cagatay Tarhan 先生と研修計画を策定し研究を行った。Chann Lagadec 先生は、血液バンクを介した血液サンプルの提供や実験に必要な試薬や細胞の提供、Mehmet Cagatay Tarhan 先生は、解析装置の提供をそれぞれご支援頂いた。

ONCOLille には、CTC を分離する実験室が用意されており、そこに今回の研修で使用した CTC 分離装置が設置されている(図 3)。



図 2. Chann 先生(左), 私(中), Cagatay 先生(右).

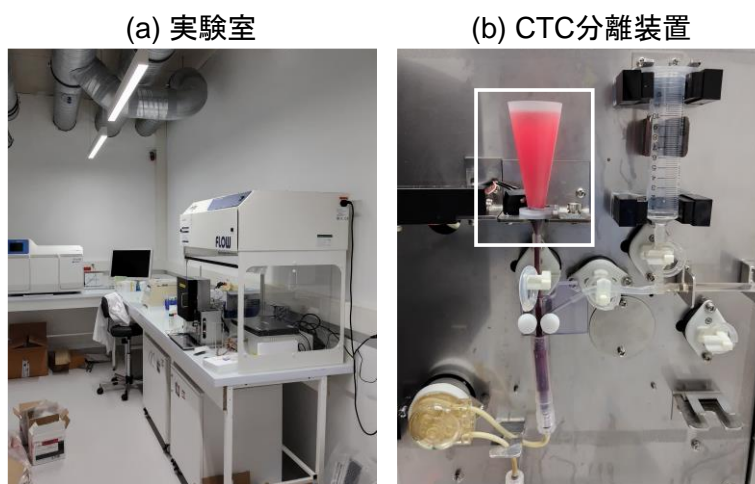


図 3. ONCOLille に設置されている研究設備. (a)実験室. (b)CTC 分離装置(白枠;血液濾過槽).

研修内容 What you learned

[研究のコンセプト]

本研修では、CTC と白血球・赤血球の“硬さ”の違いを応用し、血液から CTC を分離する(図 4a)。白血球・赤血球は CTC より柔らかいためスリット(縦×横 = 6.5 × 88 μm)を変形して通過するが、硬い CTC はスリットを通過せず捕獲される。

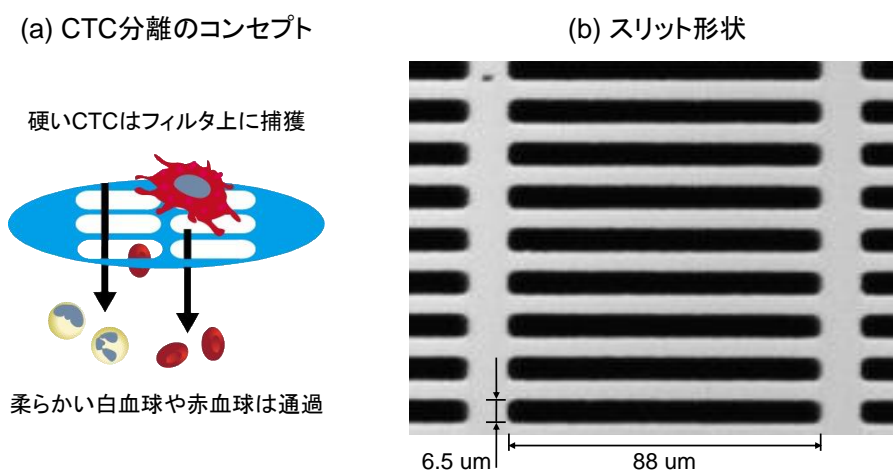


図 4. マイクロフィルタによる CTC 分離. (a)CTC 分離のコンセプト. (b)スリット形状.

[実験工程]

始めに細胞の準備について説明する(図 5)。始めに、培養容器底面に付着した MCF7 を酵素で剥離し(図 5(i))、個数を血球計算盤でカウントする(図 5(ii))。カウントした細胞の個数から細胞の培養液中の濃度を計算し、細胞の懸濁液を調製する(図 5(iii))。本研究では、血液に MCF7 細胞を添加して実験を行うが、血液中に添加した MCF7 細胞の個数を直接カウントすることはできない。そこで、血液に添加する細胞懸濁液と同じ体積の細胞懸濁液を 96well に別途滴下し、well に含まれる細胞数をカウントすることで、血液中に添加した MCF7 細胞の個数を予想する(図 5(iv))。予想のための well は、平均値と標準誤差計算のため 3 セット用意する。

次に CTC 分離装置を用いた実験工程を示す(図 6)。図 6 の実験工程は、図 3(b)の CTC 分離装置の血液濾過槽に注目し、模式的に示したものである。まず、血液と MCF7(ヒト乳がん由来細胞株)を血液濾過槽に添加し濾過する(図 6(i)~(iv))。その後、生理食塩水と血清の混合液である PBS-FBS(10% v/v)を添加し、血液を希釈したのち濾過する(図 6(v))。次にフィルタ上に残った細胞の核を染色するため Hoechst33342 を滴下し、染色する(図 6(vi))。血液濾過槽内の Hoechst33342 を除去するため PBS-FBS(10% v/v)を添加し濾過・洗浄する(図 6(vii))。最後に PBS-FBS(10% v/v)を 600 μL 逆流させ、フィルタ上に存在する細胞を血液濾過槽内に拡散させ

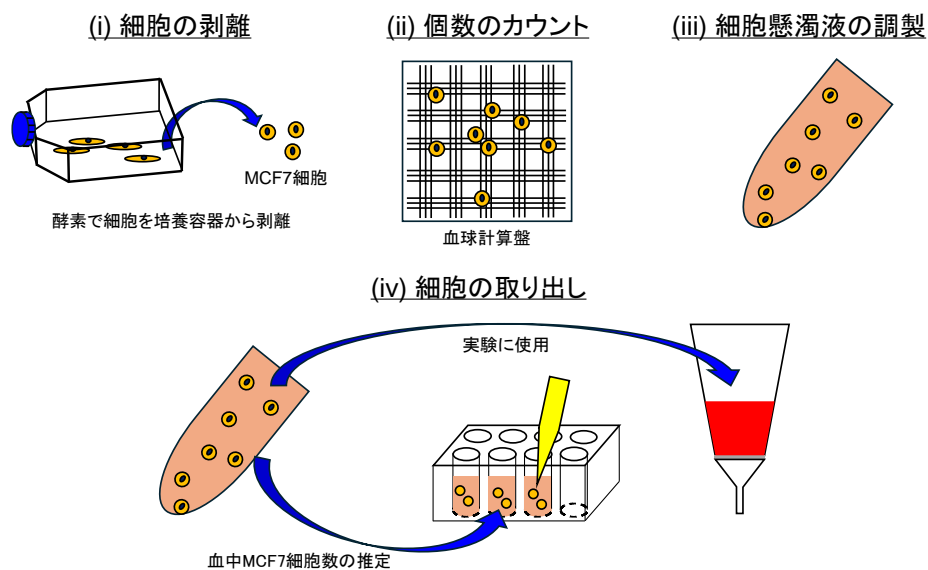


図 5. CTC 分離装置を用いた血中がん細胞分離工程.

る(図 6(viii))。逆流体積を 150 uL ずつ 4 回に分け、96well に滴下して観察する(図 6(x))。

今回の研修では、白血球の除去効率向上を目的とし、逆流・濾過を繰り返す工程を図 5(iii)の逆流工程の後に 3 回追加した(図 7)。ここで、逆流・濾過の繰り返し工程が、MFC7 細胞の回収効率と白血球の除去効率に与える影響を評価する。具体的には、逆流を 1 度行うたび逆流体積 600 uL の 25%にあたる 150 uL を回収し、96well に添加する。その後、体積が 1200 uL となるよう PBS-FBS(10% v/v)を添加し濾過する。MCF7 細胞の回収効率を評価する場合、例えば 1000 個の MCF7 細胞が血中に存在するとき、逆流・濾過の各繰り返し工程において細胞の損失がないと仮定すると、細胞の回収数は図 7(b)に示す推移に従う。実験で得られた MCF7 細胞の回収数がこの推移に沿うならば、逆流・濾過の繰り返し工程は血中の MCF7 細胞の回収効率を低下させないと評価できる。一方で白血球の除去効率を評価する場合、この推移から下回るほど効率よく除去できていると評価できる。

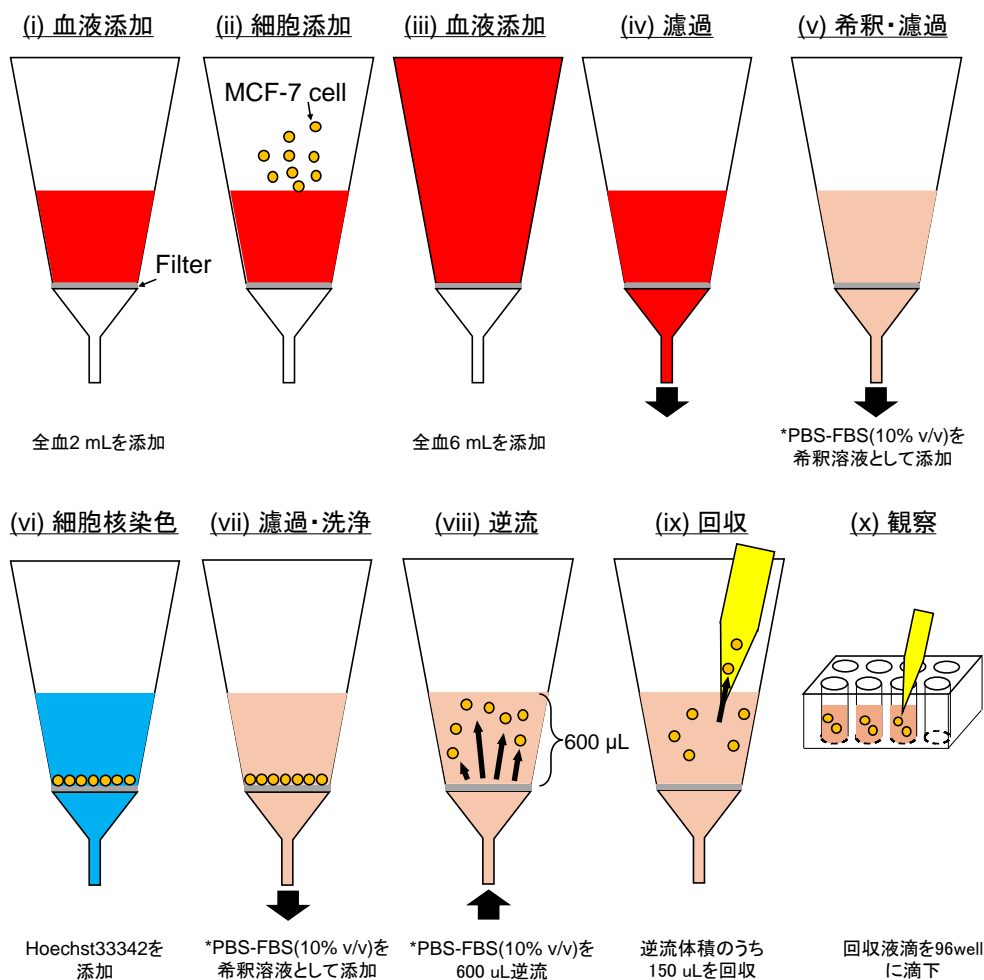


図 6. CTC 分離装置を用いた血中がん細胞分離工程.

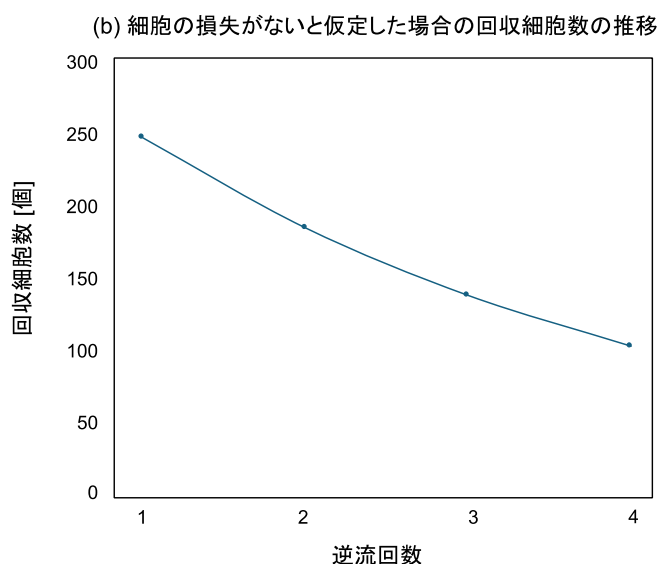
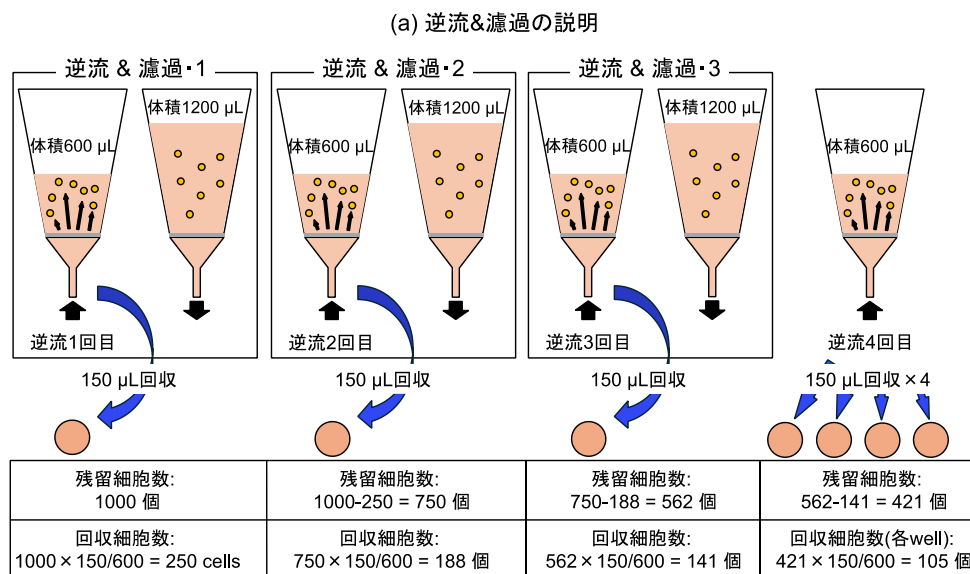


図 7. 逆流&濾過の繰り返し工程を行った際の評価方法. (a)逆流&濾過の説明. (b)細胞の損失がないと仮定した場合の回収細胞数の推移.

[実験の概要]

研修日程を表 1 に示す。第 1 週目(7/1~7/5)は、装置の立ち上げと装置の試験運転、日本と同等の結果が出るかを確認する実験を行った。第一週は血液の提供ができないということであったため、血液を使用する工程(図 6 の(i), (iii))を培養液に置き換えて実験を行った。また、実験で使用する細胞を自分で用意できるよう、細胞培養実験室(図 8)の利用講習を受けた。

表 1. 研修日程

月	日	研修内容
7	1	機械の動作確認
7	2	細胞培養実験室の利用講習
7	3	培養液を用いた模擬実験
7	4	培養液を用いた模擬実験
7	5	培養液を用いた模擬実験
7	8	培養液を用いた模擬実験
7	9	血液バンクより提供された血液を用いた実験
7	10	血液バンクより提供された血液を用いた実験
7	11	血液バンクより提供された血液を用いた実験
7	12	血液バンクより提供された血液を用いた実験 装置の立ち下げ&清掃



図 8. 細胞培養実験室.

培養液を用いた模擬実験の結果を図 9 に示す。7/3~7/8 の期間で行われた実験で得られた MCF7 細胞の回収率はそれぞれ、72%、84%、78%、95%であった。本研究において MCF7 細胞の回収率が 80%以上であれば回収率として合格と見なされる。実験初日 7/3 の実験では、ONCOLille 側で用意された、細胞を剥離するための酵素が細胞に対してダメージのあるものであったため、実験中に細胞が破損してしまい回収率が 72%と低いデータが出た。(この試薬の問題は日本でも確認されており、フランスでもある意味で再現性を確認できた。) その他の日程では、日本で用意した酵素を用いたことで、回収率が平均 86%に回復した。

7/9~7/12 の期間は、血液バンクより提供された血液を用いて実験を行った。実験は 1 日に 2 回行った。血液は血液バンクで実験の前日に採血され、24 時間以内に ONCOLille に届くよう提供される。

[MCF7 細胞の回収効率]

MCF7 の回収効率の実験結果を図 10 に示す。

7/9 の実験結果:MCF7 細胞の回収効率は 2 回とも 98%、86%と高い水準を示した。

7/10 の実験結果:ONCOLille 側より、溶血剤が実験結果に与える影響を知りたいという申し出があり、溶血剤をプロトコルに加えて実験を行った。MCF7 細胞の回収効率は、59%、44%と低い水準となった。溶血剤は、主に赤血球の細胞膜を破壊する試薬であるが、MCF7 細胞にも

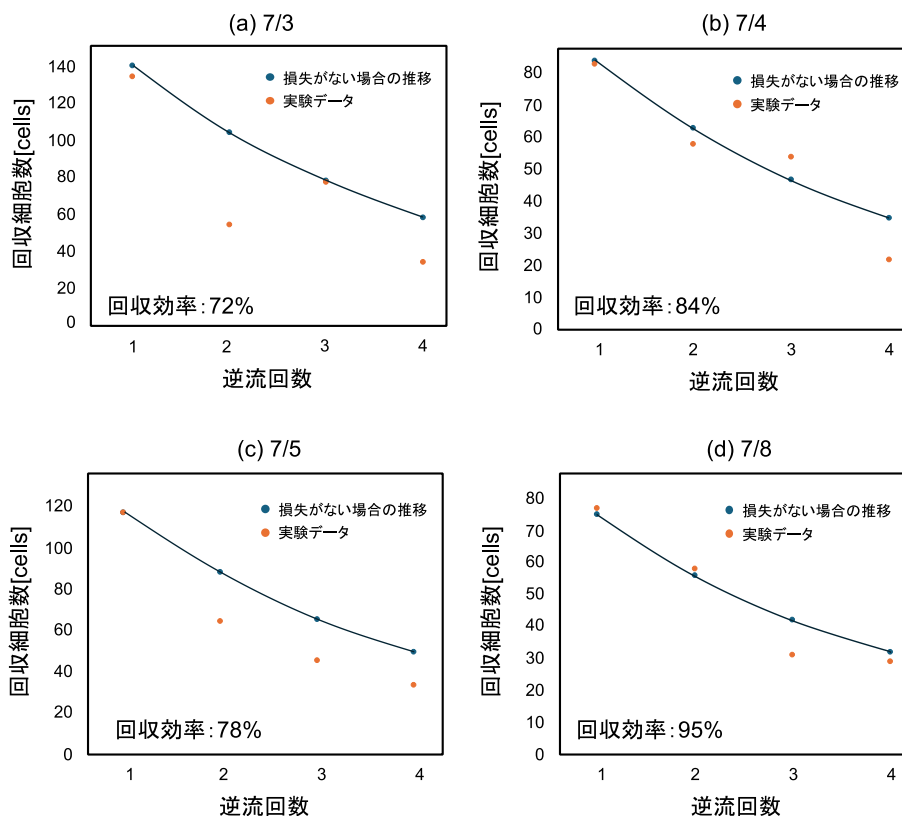


図 9. 血液の代わりに培養液を用いた場合の MCF7 細胞の回収効率. (a)7/3. (b)7/4. (c)7/5. (d)7/8.

ダメージを与え、回収効率を下げる可能性があることが示唆された。

7/11 の実験結果: MCF7 細胞の回収率がそれぞれ 97%、70%であった。2 回目の実験での MCF7 細胞の回収率が低かった理由として、細胞の状態が考えられる。細胞は毎日 13:00 に準備するが、2 回目の実験までに 3 時間ほど常温で保管していたため、細胞の状態が悪化してしまい、回収効率が低下してしまったと考えられる。

7/12 の実験結果: MCF7 細胞の回収率は 60%であった。MCF7 細胞の回収効率が低下した理由として、血液の状態が考えられる。日本でも採血から 36 時間以上経過した血液を用いた場合、MCF7 細胞の回収効率が 21%まで低下することが確認されている。この日は、7/11 に届いた血液を冷蔵庫で保管したものを実験に使用しており、36 時間以上経過していた。具体的なメカニズムは不明であるが、採血からの経過時間と MCF7 細胞の回収率との間には関連があることが示唆される。

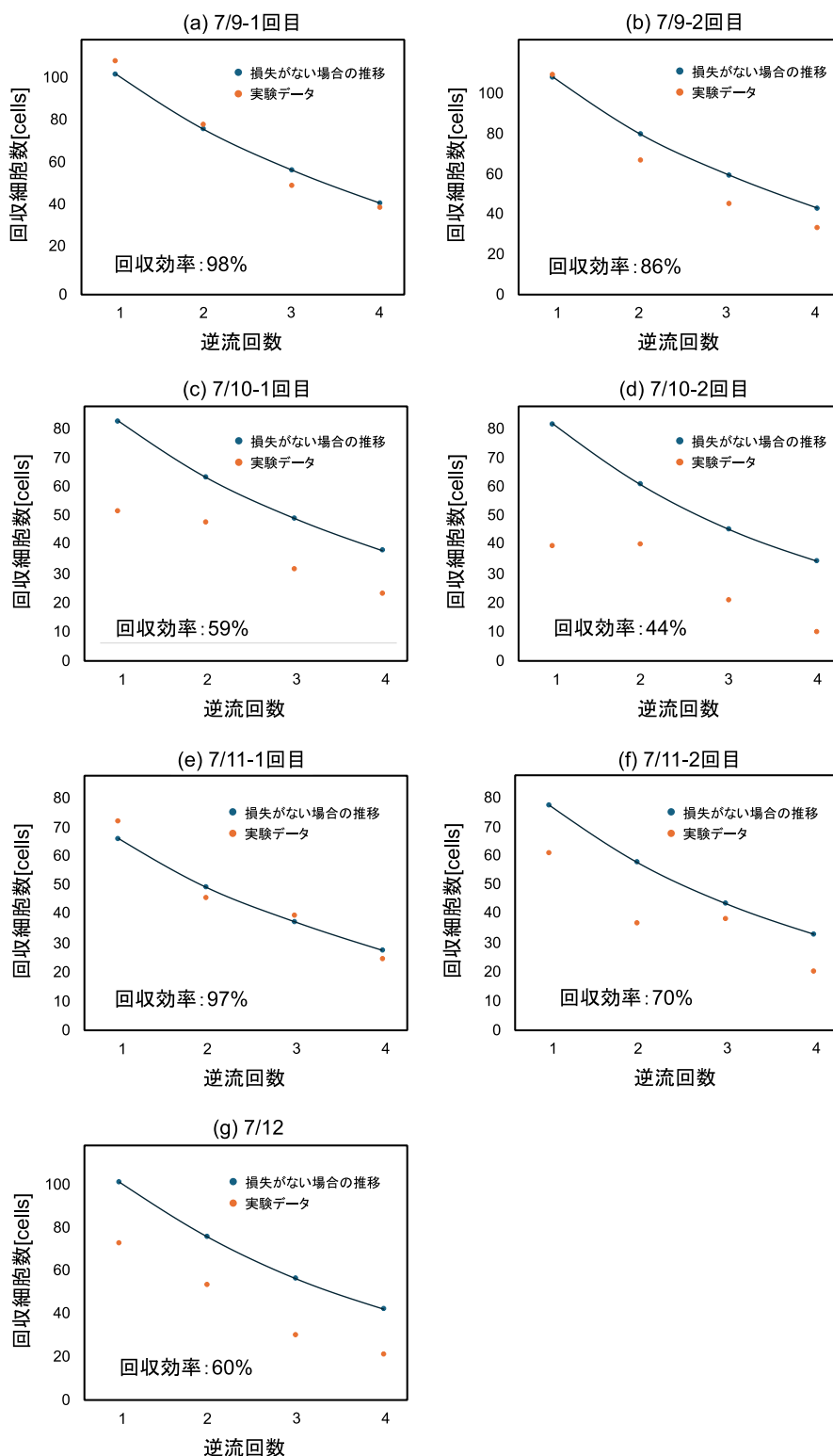


図 10. 血液サンプルを用いた実験の MCF7 細胞回収効率. (a)7/9-1 回目. (b)7/9-2 回目. (c)7/10-1 回目. (d)7/10-2 回目. (e)7/11-1 回目. (f)7/11-2 回目. (g)7/12.

[白血球の除去効率]

回収された白血球の個数の推移を表 2 に示す。ここで 4 回目の個数は、最後に回収された白血球の総個数を 4well で割った平均として表記している。回収された白血球の総個数±標準誤差は、136,086±12,929 個であった。さらに 1 回目で回収された白血球の個数を基準として、正規化した白血球の回収個数の推移を示したグラフを図 11 に示す。白血球は、逆流と濾過を繰り返すごとに推移線から下回っており、除去できていることが伺えるが、劇的な除去効果を確認することはできなかった。

ONCOLille 側の研究者と議論した結果、逆流と濾過の繰り返しは白血球の除去効率向上に寄与する可能性があるが、同時に柔らかい CTC も喪失する懸念がある。そのため、白血球が残っていてもできる解析方法を組み合わせるなどの検討を今後行っていくこととなった。

表 2. 回収された白血球の個数の推移

月	日	回収回数				回数された白血球の総個数
		1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	
7	9	35,721	26,194	15,164	12,295	126,259
7	9	37,449	26,532	17,130	11,472	126,999
7	10	35,999	23,954	17,340	13,919	132,969
7	10	31,047	38,324	20,782	7,539	120,309
7	11	37,752	31,278	17,453	13,068	138,755
7	11	52,530	26,245	22,590	14,908	160,997
7	12	43,839	35,457	19,712	11,827	146,316

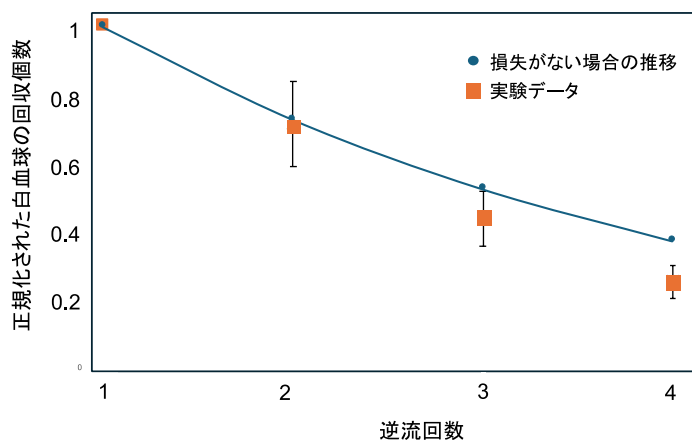


図 11. 正規化された白血球の回収個数の推移.

[まとめ]

今回の研修で達成できた成果は下記の3点である。

- (1) **血液を用いた実験で再現性のあるデータが取れたこと:**これまで血液サンプルを実験に使用すると、血液濾過槽やマイクロフィルタ上に血のりが形成されてしまい、実験を行うことができなかった。この問題を克服するため、様々な濾過のバッファを検討した結果、PBS-FBS(10% v/v)が適していることを日本側で見出した。今回フランス側でも問題なく使用できたことで、今後安定的に結果が得られると ONCOLille 側の研究者も納得させることができた。実験結果を稼ぐことは、臨床医にプロジェクトへ参加して頂く上で非常に重要である。
- (2) **血中の MCF7 細胞を高回収率で回収できたこと:**CTC は血中において極めて希少であるため、血中の CTC を可能な限り全て取り出すことは極めて重要である。そのため、血中がん細胞(本研究では MCF7 細胞)を高回収率で取り出すことが求められる。本研究では、4 回の試行(7/9、7/11 にそれぞれ 2 回ずつ行った実験)を通じ平均 88%の MCF7 細胞の回収率を達成できたことから、我々の CTC 分離システムの性能の高さを示すことができた。
- (3) **逆流と濾過の繰り返しによる白血球の除去効率を評価できたこと:**今回、逆流と濾過工程を繰り返した際の白血球の除去効率を評価したが、劇的な除去効率向上は確認できなかった。しかし一方で、マイクロフィルタを用いた CTC 分離手法と相性の良い解析手法の接続を検討する良いきっかけとなった。今後、臨床医も交えて研究の方向性を決めていく。

研修先で特に印象に残ったこと The most impressive thing

今回の研修では、日本とフランスの血液サンプルに対する認識の違いが印象に残った。日本では倫理審査を通過すると、実験のたび共同研究先より血液検体を頂くことが可能だが、フランスでは血液を実験することに対し厳しい法律があり、血液を使うことが難しい。そのため、今回は渡航の半年前から血液の使用に関して議論していたが、調整に次ぐ調整で渡航計画の見直しを何度か行った。そんな中でも血液バンクや臨床医との調整を続けて下さった Chann Lagadec 先生には心より感謝している。

※研修先でのご自分の写真を数枚添付してください。Please add your photos taken at the destination.