

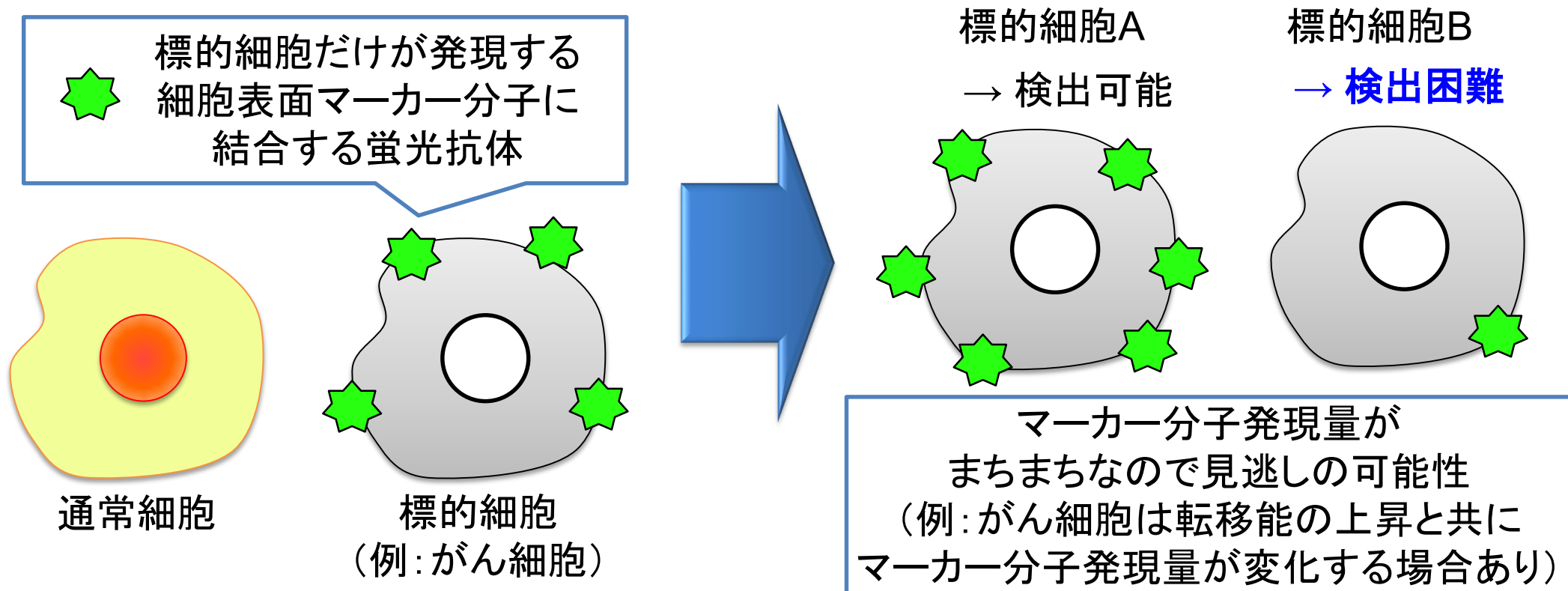
カップ形状微小電極を用いた 細胞表面分子の 電気化学発光計測による検出

産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門
AIST-INDIA機能性資源連携研究室

主任研究員 金 賢徹 (KIM, Hyonchol)

2020. 9. 10

蛍光抗体標識法による標的細胞の検出技術と課題



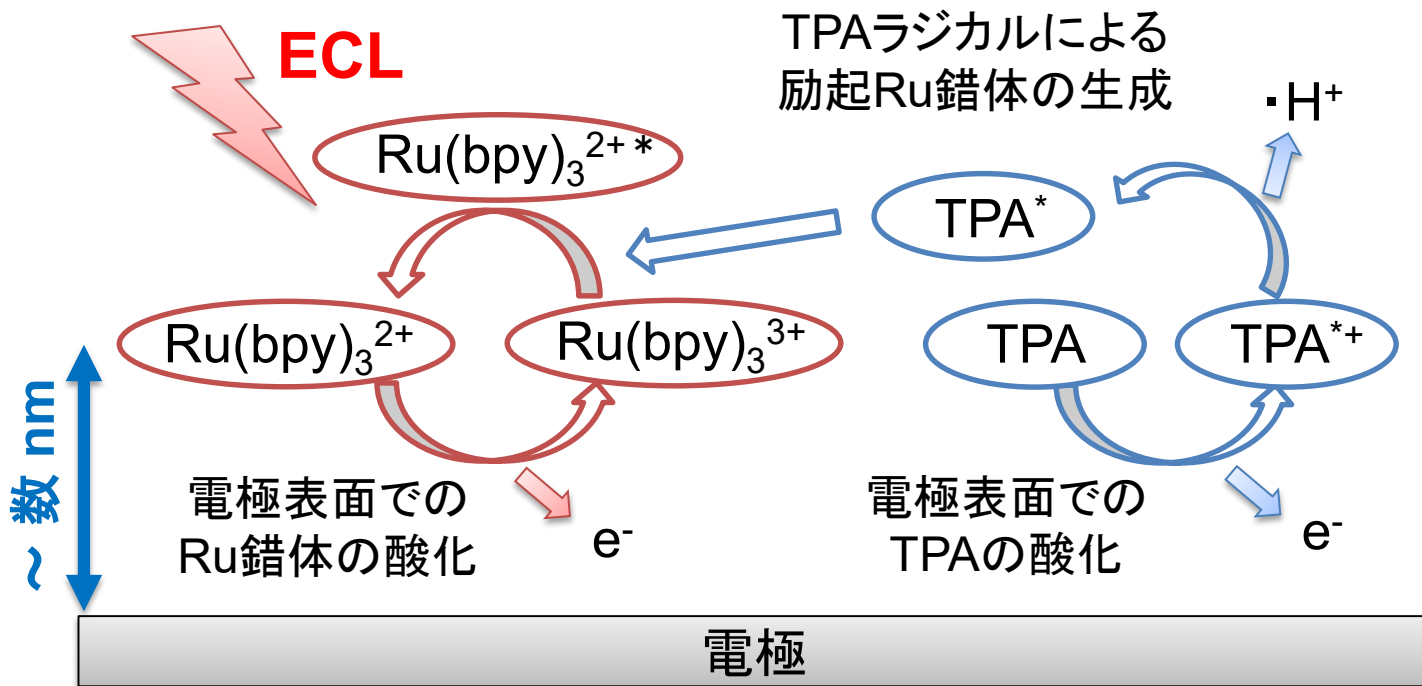
蛍光計測法では検出感度不足で一部の標的細胞を見逃す場合あり

様々なマーカー分子を組み合わせて検出精度を上げているが細胞の多様性のため如何なるマーカー分子を利用しても低発現細胞は存在

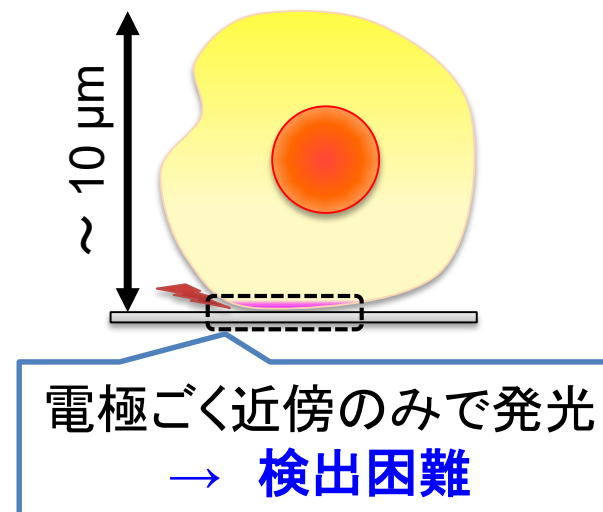
本質的な改良のためには、検出感度の向上が必要

電気化学発光(ECL)計測の概要と 標的細胞検出への適用時の課題

ルテニウム(Ru)錯体の例



細胞表面分子検出に
ECL法を適用した場合

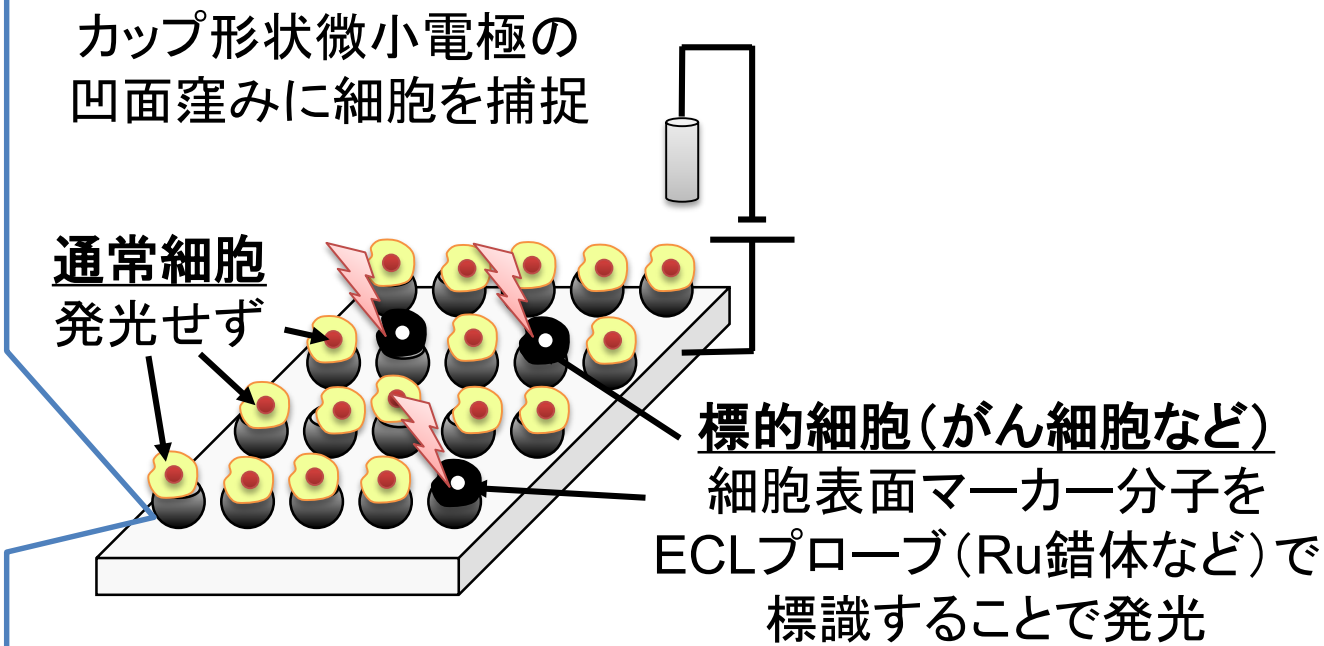
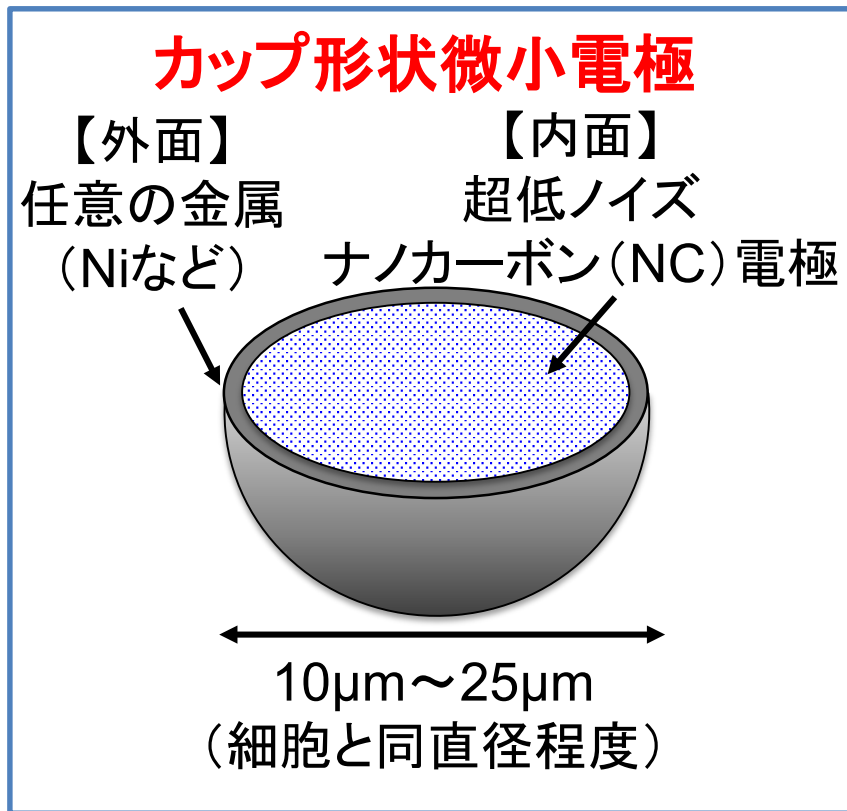


$\text{Ru}(\text{bpy})_3$: Tris(bipyridine) ruthenium
TPA: Tripropylamine

【ECL計測法の特徴】

- ・低バックグラウンドノイズ
- ・極めて高い検出感度 (蛍光法以上)
- ・電極表面ごく近傍でのみ発光

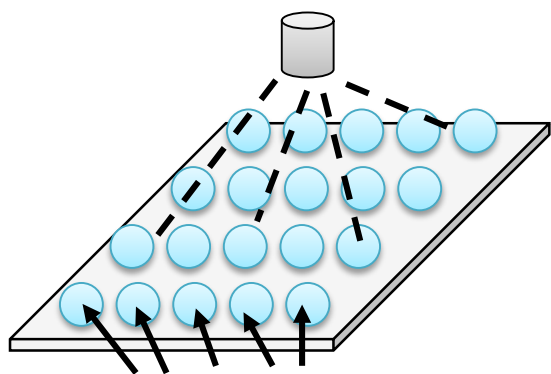
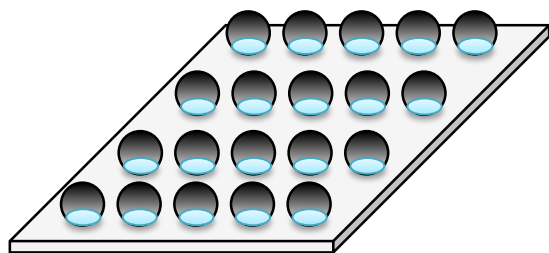
【新技術】 カップ形状微小電極の作製と ECL計測法の細胞表面発現分子検出への適用



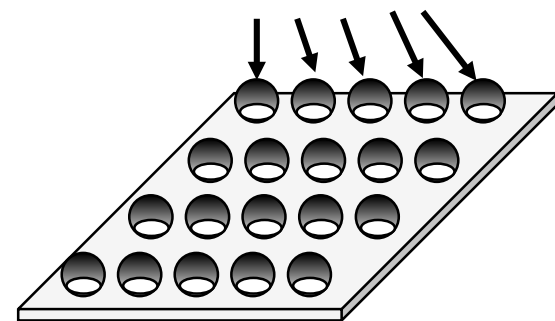
細胞形状に合わせた曲面電極を作製し、細胞表面の広範囲を電極表面に密接させることで、ECL計測を細胞表面分子検出に適用

カップ形状微小電極の作製手順(アレイ型)

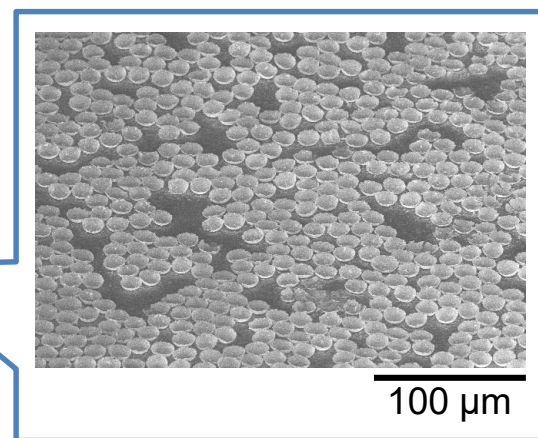
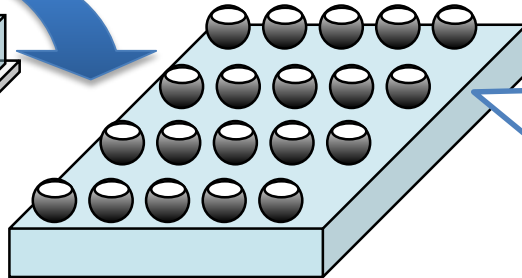
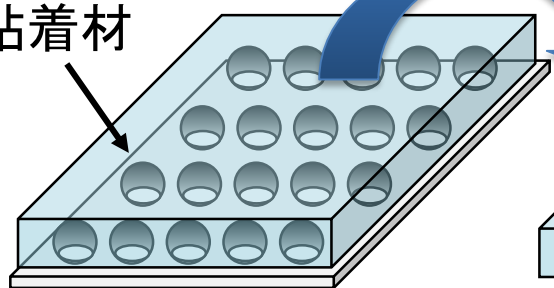
NC→Niの順に薄膜形成

鋳型ポリスチレン粒子
(10~25 μm)加熱により
ポリスチレン粒子を除去

カップ形状微小電極

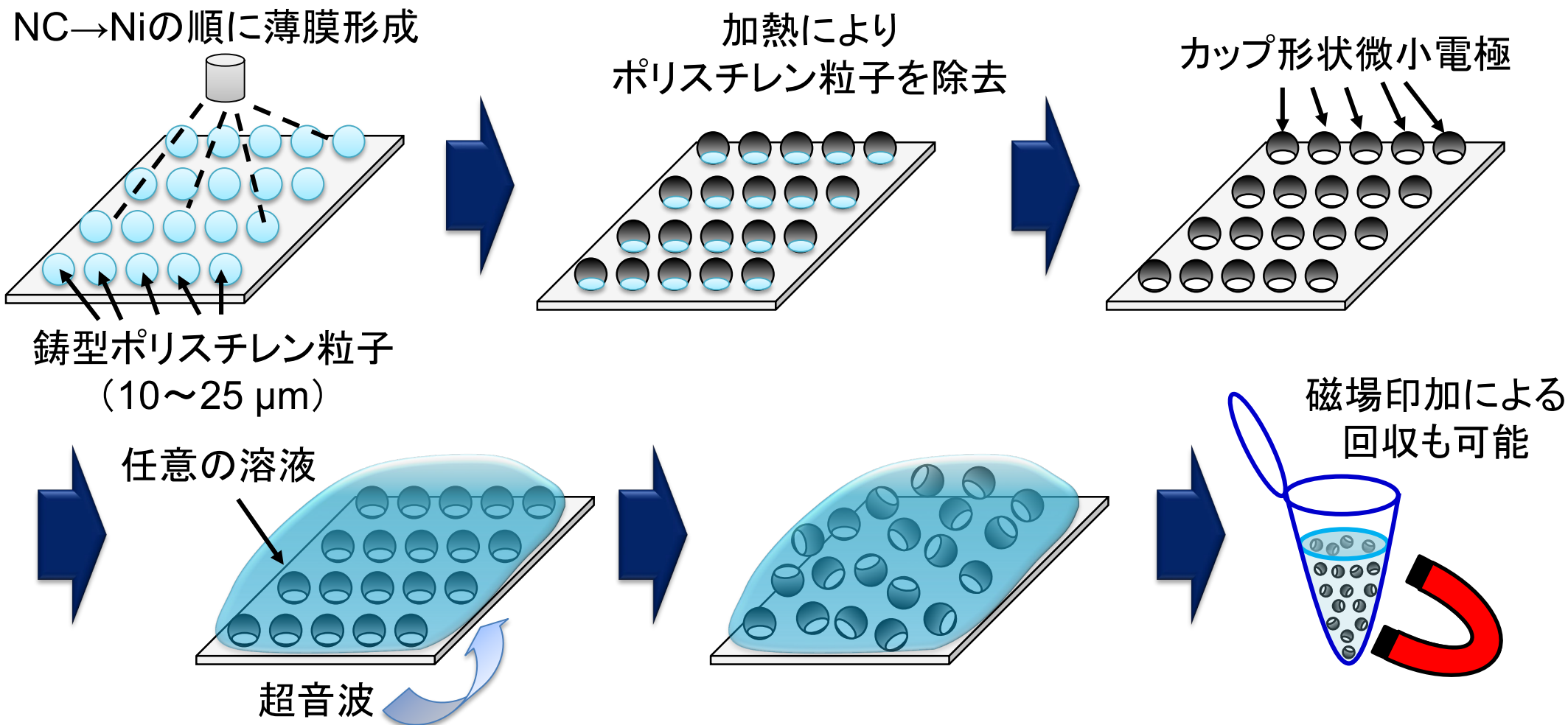
導電性
粘着材

転写

カップ形状
微小電極アレイ

ポリスチレン粒子を鋳型として細胞と同直径程度の
カップ形状微小電極を作製することに成功

カップ形状微小電極の作製手順(溶液分散型)



ポリスチレン粒子を鋳型として細胞と同直径程度の
カップ形状微小電極を作製することに成功

新技術の特徴・従来技術との比較

任意の直径（数十nm～数十 μ m）の
低ノイズ曲面電極を提供可能

微小電極を基板上に配向配置させること、
溶液中に分散させることが可能

微小電極は磁気微粒子でもあり、
磁場印加による制御が可能

想定される用途

血中循環がん細胞の検出

環境中の微粒子や微生物の検出

高感度な免疫測定

特徴的構造を持つ新規マイクロ材料

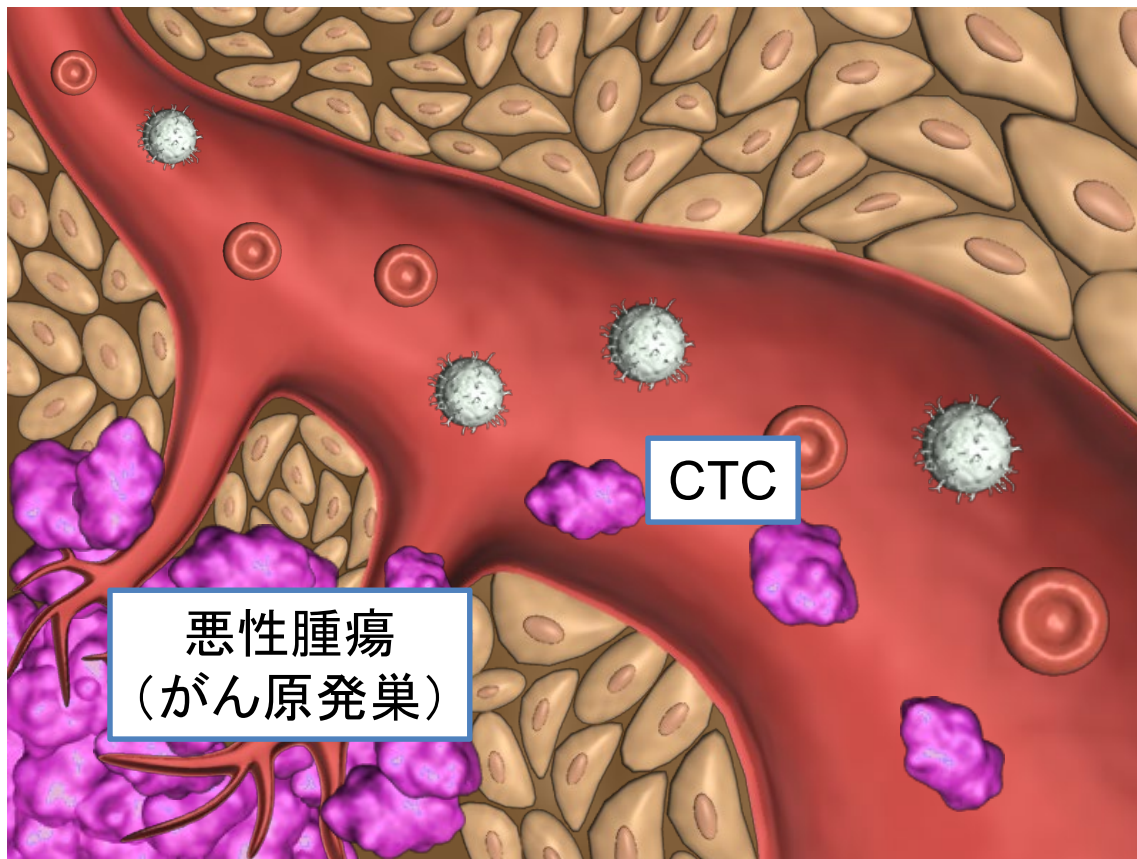
血中循環がん細胞 (CTC) とは

血中循環がん細胞
(Circulating tumor cell, CTC)

血行性のがん転移が生じる際に血液中を流れるがん細胞。

血液数mLあたり数個～数百個程度存在すると考えられており、がんの転移に深く関与する。

血液を採取しCTCの有無を検査する方法は、身体的・経済的負担の少ないがん診断法のひとつとして注目されている。



CTC診断が実現した場合の恩恵

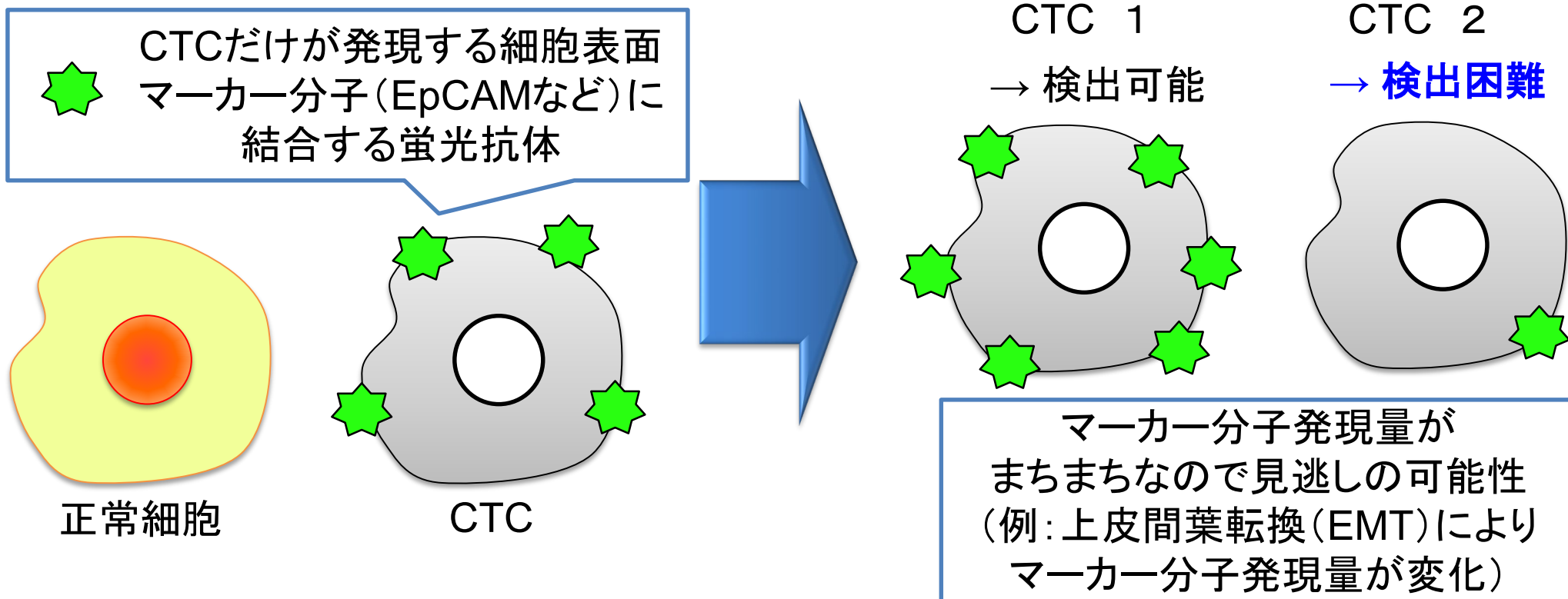
CTC存在有無を正確に判定できれば・・・

- ・身体的、経済的な検査負担の軽減
- ・がん切除手術後の再発有無を定期的血液検査で診断
- ・抗がん剤投与後の薬剤効果を診断
- ・高精度画像診断への早期動機付けが可能

さらにCTCを回収して種類を特定できれば・・・

- ・遺伝子変異検査など他のがん検査との組み合わせによるがん診断精度の向上
- ・適切な抗がん剤の種類と投与量の選択に貢献、副作用の軽減
- ・がん転移メカニズム解明の基礎研究への貢献

既存の代表的なCTC検出技術と課題



蛍光計測法では検出感度不足で一部のCTCを見逃す場合あり

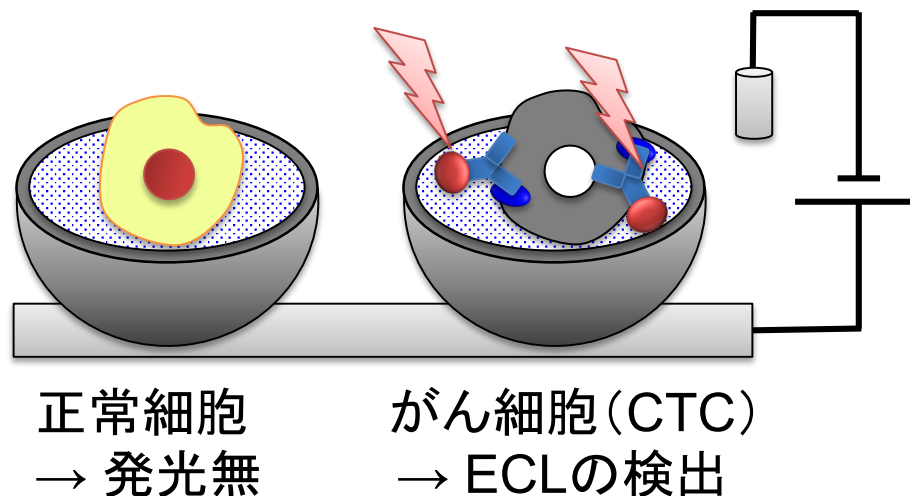
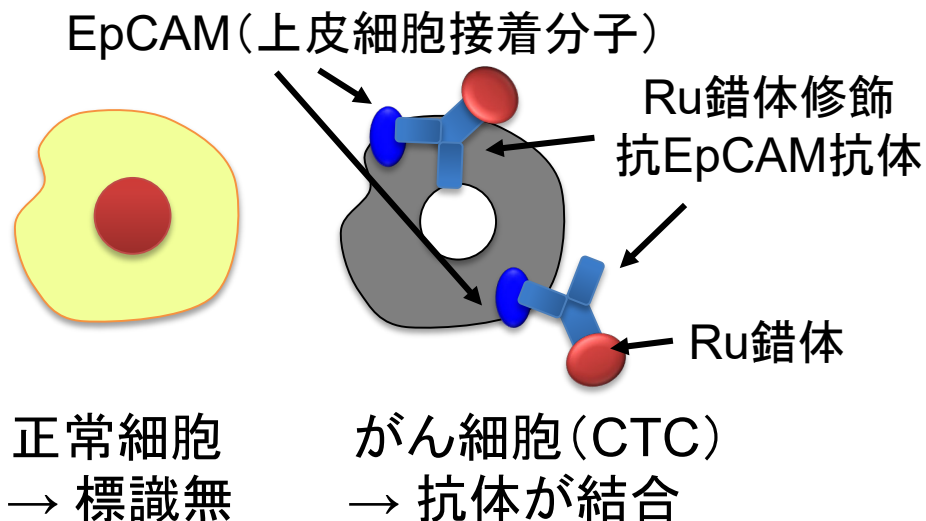
様々なマーカー分子を組み合わせて検出精度を上げているが
CTCの多様性のためマーカー分子微量発現細胞が存在

本質的な改良のためには、検出感度の向上が必要

カップ形状微小電極アレイを用いたがん細胞表面発現 EpCAM(代表的CTC検出マーカー)のECL法による検出

がん細胞表面のEpCAMを
Ru錯体修飾抗EpCAM抗体で標識

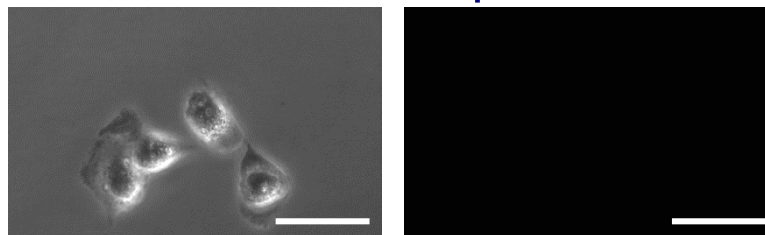
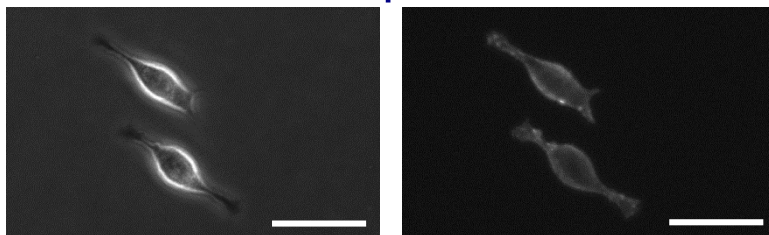
カップ形状微小電極アレイへの捕捉と
電気化学発光(ECL)による計測



EpCAM高発現・微量発現モデルがん細胞の免疫蛍光染色像

MCF-7 (EpCAM^{high})

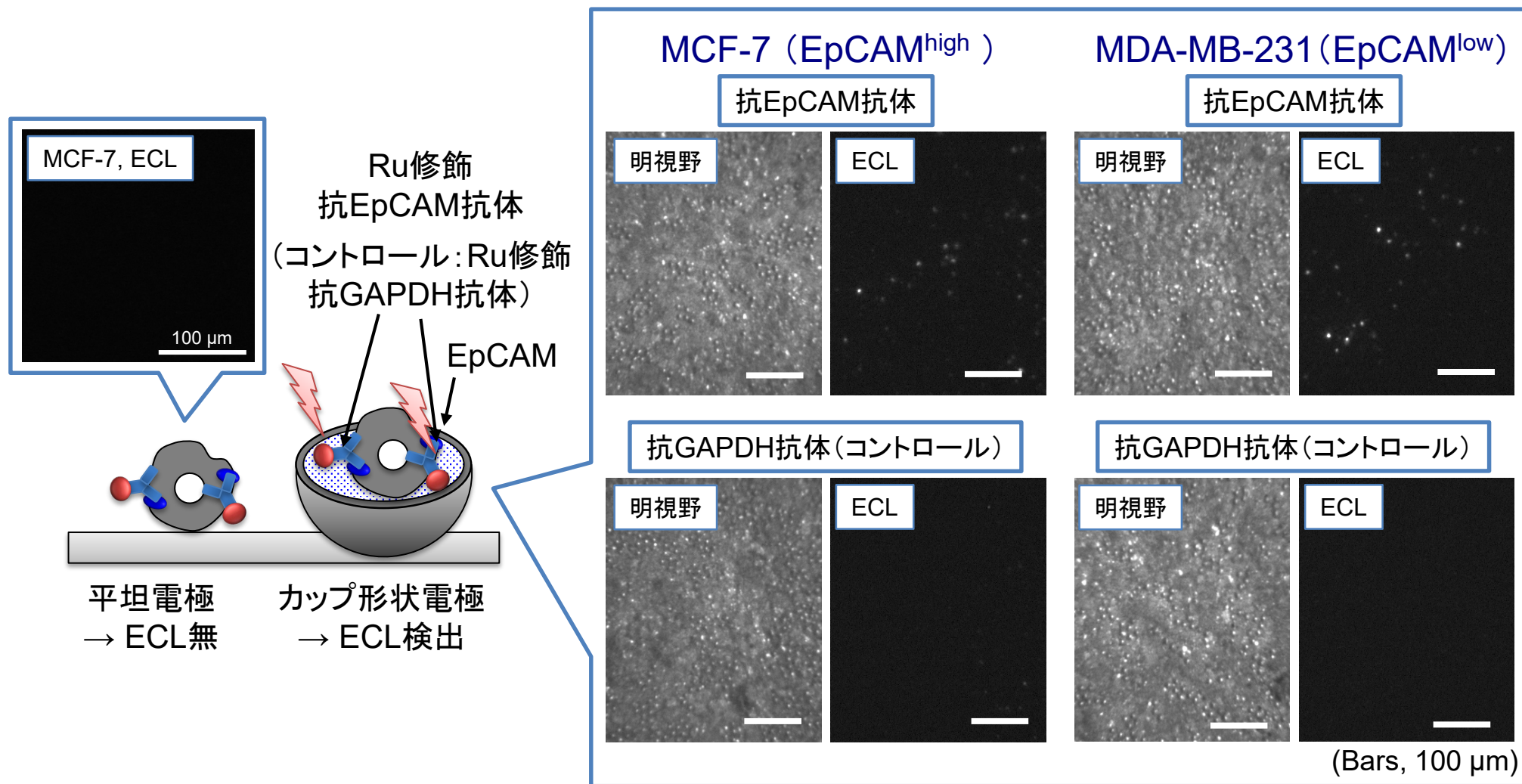
MDA-MB-231 (EpCAM^{low})



(Bars, 50 μm)

蛍光検出が難しいEpCAM微量発現がん細胞の検出を目指す

カップ形状微小電極アレイを用いたがん細胞表面発現 EpCAM(代表的CTC検出マーカー)のECL法による検出



細胞表面発現分子の検出にECLを適用することに成功
蛍光では検出が難しいEpCAM微量発現がん細胞の検出に成功

実用化に向けた課題

【達成済み項目】

- ・様々な粒径、素材のカップ形状微小構造体の作製
- ・凸面と凹面の素材が異なるカップ形状微小構造体の作製
- ・カップ形状微小構造体凹面窪み部分への細胞の捕捉
- ・凹面を電極素材とし、捕捉した細胞の表面に発現する分子のECLによる高感度検出

【今後の検証項目】

- ・モデル血液を用いたCTCの検出の実証
- ・臨床サンプルを用いたCTCの検出の実証
- ・汎用的な利用を想定した計測技術のシステム化、低コスト化
- ・微生物など動物細胞以外の試料のカップへの捕捉と検出
- ・カップ形状微小構造体の新たな用途の開拓

企業への期待

本技術を用いた新たな測定対象のご提案と
実証のための共同研究の推進

生命科学分野のみならず、様々な分野での本微小構造体の
利用に関するご提案と、実証のための共同研究の推進

CTC検出など実証試験の完了後、検出技術の
システム化や自動化、本微小構造体の量産化に関する連携

本技術に関する知的財産権

【発明の名称】

微小構造体、その作製方法およびそれを利用した分子検出方法

【出願番号】

特願2019-034275、 PCT/JP2020/007641

【出願人】

国立研究開発法人産業技術総合研究所

【発明者】

金 賢徹、加藤 大、小島 直、山村 昌平、鎌田 智之

お問い合わせ先

国立研究開発法人産業技術総合研究所
生命工学領域

イノベーションコーディネーター

TEL: 029-862-6032

FAX: 029-862-6048

E-mail: life-liaison-ml@aist.go.jp