

研究報告書

令和元年度：B課題

令和2年5月23日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 岡山大学病院

住 所 岡山市北区鹿田町2-5-1

研究者氏名 井上博文



(研究課題)

高品質検体を得るためのテラヘルツ波を用いた未固定液状検体中の癌細胞含有割合評価法の開発

平成31年 1月 24 日付助成金交付のあった標記B課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

研究助成金研究報告

令和 2 年 5 月 23 日現在

【研究者】：井上 博文

【研究課題】：一般課題 B

【研究機関】：平成 31 年 4 月 1 日から令和 2 年 3 月 31 日

【研究題目】：高品質検体を得るためのテラヘルツ波を用いた未固定液状検体中

の癌細胞含有割合評価法の開発

【目的】

がんゲノム医療の検査検体はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックが主となってい
るが薄切→染色→病理診断・腫瘍割合評価と核酸抽出工程までに時間を要する。

我々は人体に無害で空港のボディースキャンで使用されるテラヘルツ波で計測する Terahertz
chemical microscopy (TCM) を用いた未染色 FFPE 切片からの病変部の画像化を検証した。しかし
FFPE 切片を TCM-Sensing plate (TCM-SP) に固定して一定条件を保つことが非常に困難で再
現性に乏しいことが判明した。

改良策として TCM-SP に Cytokeratin AE1/AE3 抗体を固定し抗原抗体反応直接法を利用した方
法で細胞浮遊液中の目的細胞の検出実験 (Fig. 1) を施行したところ、含有する細胞数によって
信号強度が異なることを発見した。

しかし直接法は未反応細胞への洗浄工程回数によって不均衡な信号強度を認めた。改良策として
抗原抗体間接法を応用した変法で対応し感度の向上を認めたが洗浄による不均衡な信号強度を
改善するまでには至らなかった。

本研究では TCM-SP 上の抗体固定方法の検討、抗体反応の条件設定を目的とした。

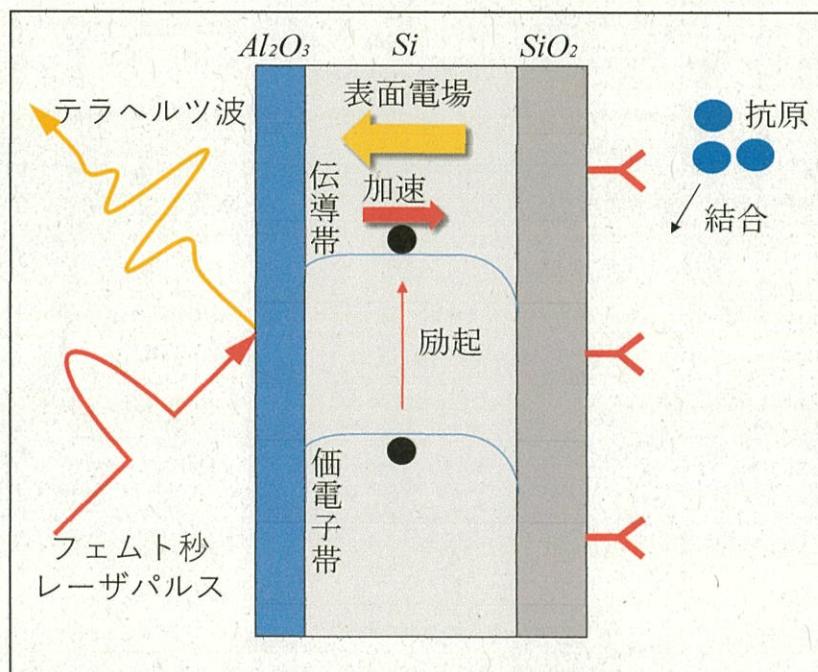


Fig. 1 TCM を用いた抗原抗体反応方式の検出原理 概略図

【方法】

① TCM-SP 上、抗体固定方法の検討

化学修飾法と物理吸着法による抗体固定状況確認試験

TCM-SP 上のエステル基をカルボキシル化し抗体と水素結合処理した Cytokeratin AE1/AE3 抗体固
定 TCM-SP と 24 時間放置沈降によって固定化させて物理吸着させる。Au 標識抗 mouse IgG 抗体を
反応、Ag イオンにて増感させて走査型電子顕微鏡像にて TCM-SP 上の抗体固定状況を確認する。

②抗体反応の条件設定の検討

1. TCM-SP ウェル (Fig.2) に NaN_3 (0.015M) を含む AE1/AE3 を 4 つの全てのウェルに $30\mu\text{l}$ ずつ滴下し, 4°C下の湿潤箱で 24 時間かけて固定化
2. AE1/AE3 を取り出し, Antibody Diluent (ventana, code : 251-018) でピペッティングした後, 3.5%スキムミルクで 15 分ブロッキング
3. ブロッキング剤を取り出し, Antibody Diluent で 1 回ピペッティング, 4°C下の湿潤箱で 6 時間放置・安定化
4. 反応前のデータとして Antibody Diluent をウェルに入れた状態で TCM にてイメージング計測 (測定間隔は 0.5mm ステップ).
5. 培養細胞 (HCC827GRH1) の濃度 $10^2/\text{ml}$, $10^3/\text{ml}$, $10^4/\text{ml}$ をそれぞれ 3 つのウェルに滴下, 4 °C下の湿潤箱で 12 時間反応
6. 抗原を取り出し, Antibody Diluent で 10 回ピペッティング, 反応後のデータとして Antibody Diluent を入れた状態で TCM にてイメージング計測 (測定間隔は 0.5mm ステップ).

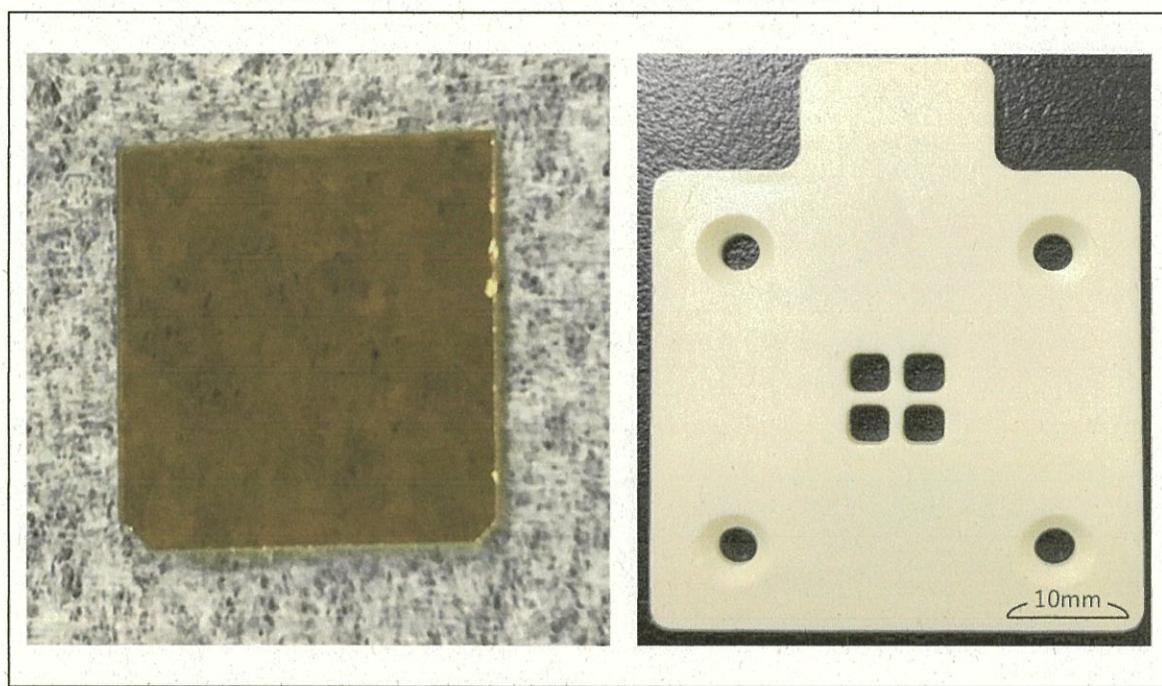


Fig. 2 TCM-SP (左) と TCM-SP 固定用プレート (右)
TCM-SP 上に固定用プレートを貼り付ける。中心部口の 4 力所が抗体固定並びに被検体充填位置

【結果】

①物理吸着法（共有結合）に増感されたAgイオン増感二次抗体の反応を認めた。（Fig. 3）

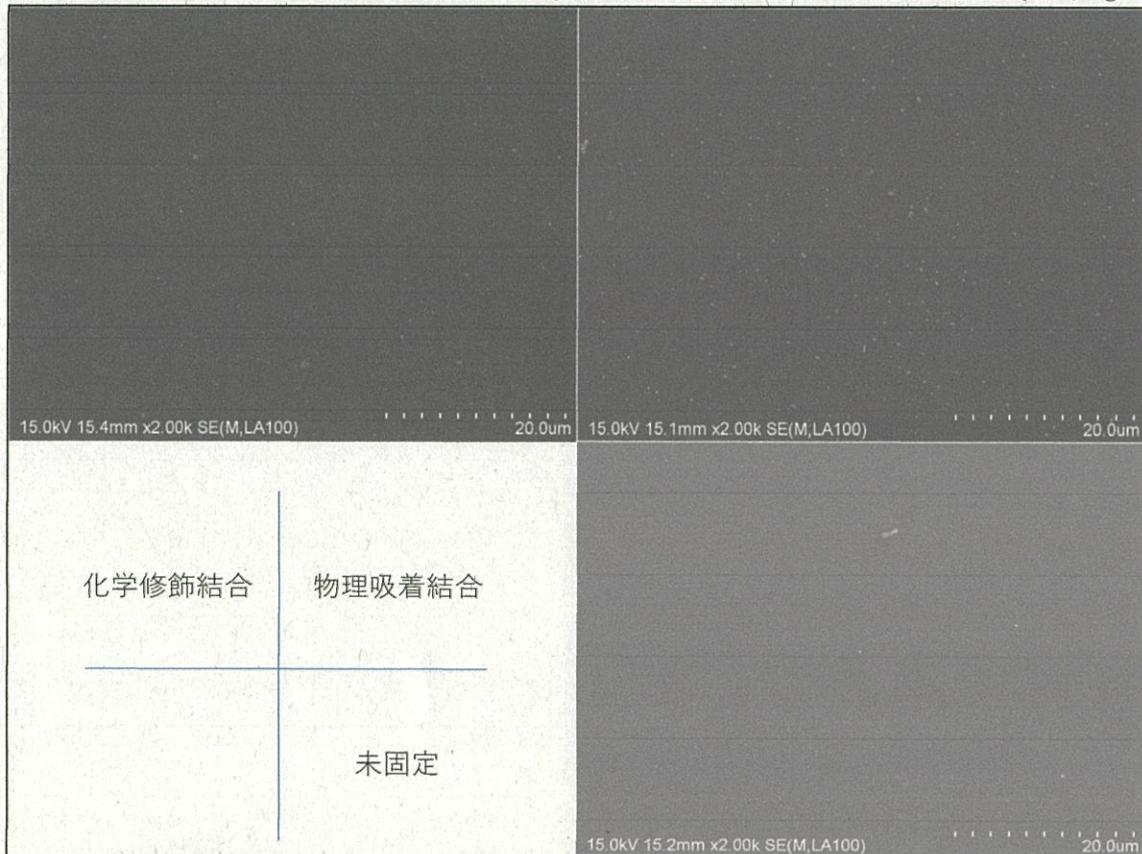


Fig. 3 走査型電子顕微鏡像

白色調斑点が銀で増感された抗体固定部位。物理吸着に多くの斑点を認めた。

②各ウェルの2mm角の範囲のテラヘルツ波強度の平均値を算出した。すべてのウェルでリファレンスとして用いたウェルのテラヘルツ波強度変化と同様の変化が起こっていると考えられ、リファレンスのウェルの平均をすべてのウェルから引くことでオフセットした。合計三回の測定結果をまとめた。（Fig. 4）

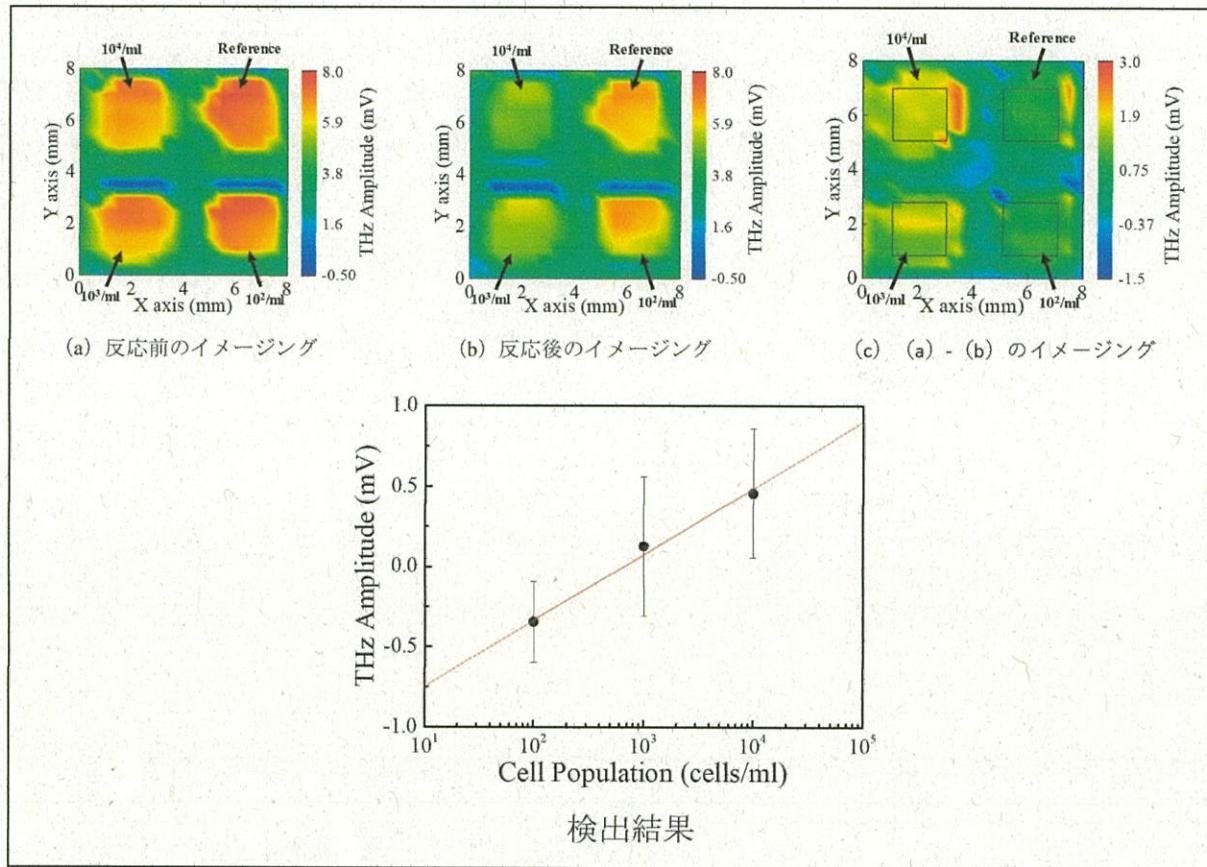


Fig. 4 抗原(培養細胞)濃度とテラヘルツ波強度の関係

TCM を用いてがん細胞の濃度変化によるテラヘルツ波強度分布のイメージング化の実現、がん細胞の定量解析の示唆、さらにその再現性を示すことができた。

【考察】

抗原抗体法を利用した TCM での測定は可能であることを確認した。しかし、得られる電位差は非常に微弱であり被検体である細胞の状態を確認する必要がある。今回の検討では未固定状態の培養細胞を用い実施したが細胞変性による影響が考えられた。

また測定方法についても今回的方法であると検出しようとする抗体をその都度、SP 上に固定する必要があり今後、実装化を考慮するとコスト面で支障が生じると考える。他に固定方法についても更なる改良が必要と考えられる。

【謝辞】

2年間にわたり貴財団からご支援賜り本研究からテラヘルツ波は微量の検体から目的とする細胞の有無を示す信号を検出可能であることを確認しました。人体に無害で高感度なテラヘルツ波を医工連携で開発を進めがん診療においての迅速高感度検査機器として使用可能か更なる検討を進めて参ります。公益財団法人 がん研究助成振興財団各位の皆様に深く感謝申し上げます。