

DYNABEADS LETTERS



Dynabeads を用いた液状検体からの癌細胞分離同定の試み — 体腔液細胞診検査への応用 —

栃木県立がんセンター研究検査部
井村 穰二、圓谷 勝

1. 目的

日常の細胞診検査はその検体採取の簡便さから多くの材料で汎用されているが、問題点も多く、特に体腔液の細胞診検査は、その診断に難渋する機会が多い。これらの多くは、体腔表面を被覆している中皮細胞や反応性に浸潤している炎症性細胞等、いわゆる非腫瘍性細胞が採取検体内に多数混入しているような場合である¹⁾。従来は、特にこれら非腫瘍性細胞の除去あるいは癌細胞のみの分離等は行っておらず、この両細胞を短時間に顕微鏡下に区別しながら、当該細胞を同定する事はある程度の経験と集中力を要し、観察者の負担も大きい。また、極く少数しか癌細胞が採取されていないような検体では、細胞診標本の作製過程中的細胞の回収が良好でなく、最終的に標本上にこれら細胞が存在しない場合が実際上あることも否めない。この様に特に体腔液等の液状検体における細胞診検査の検体処理法および診断法が抱えている問題点を解決するために、種々の抗体を結合させたDynabeads を用いて癌細胞を分離同定する新しい方法について試みた。

2. 材料と方法

1) 材料

基本的検討材料としてラット由来乳癌細胞株(NMU)およびラット由来中皮細胞株(4/4.M.4) (何れもAmerican type culture collection : ATCC よりの供与)を種々の割合(細胞数)で両者を混合したものをを用いた。一方、臨床材料として、腔水貯留を来した肺癌あるいは消化器癌患者から採取された胸水あるいは腹水を使用した。

2) 使用抗体およびDynabeads

上皮性細胞のみを認識し、中皮細胞あるいは炎症性細胞とは反応しない抗体としてMOC-31(EURO-DIAGNOSTICA)を使用した^{2),3)}。抗体を結合させるビーズとしてDynabeads M-450 Sheep anti-Mouse IgG (DYNAL A.S)を使用した。

3) 材料の前処置

用いた臨床検体中の細胞と培養細胞の洗浄および固定は下記の如く行った。

1. 上記液状検体を遠心分離 (2,500 rpm : 1,200 x g、10 min) により細胞成分のみを回収する。
2. 10 mM EDTA-2Na 添加 10 mM PBS (pH 7.4) で洗浄、遠心分離を数回、繰り返し、細胞表面に付着している蛋白成分等を除去する。
3. 95% エタノールに再懸濁し、細胞を固定する (15 min .)。
4. 再度の遠心分離により、沈渣として細胞を回収する。
5. 脱エタノールを目的として、数回10 mM PBS で洗浄し、ビーズ反応まで沈渣として保存する。

4) 抗体結合ビーズの作製

1. 非特異的結合反応の防止を目的として、Dynabeads 2 ml に5% スキムミルク(DIFCO LABORATORIES)添加 10 mM PBS (pH 7.4) 2 ml を加え、2 hrs.、室温で反応させる。
2. 10 mM PBS で数回洗浄する。
3. 洗浄後ビーズ液と上記希釈抗体溶液をEppendorf 型チューブ(容量1.5 ml) で混和する。
4. 未反応抗体除去を目的として、Dyna MPC (Magnetic Particle Concentrator) - E : MPC - E を用いて、抗体結合ビーズのみを回収する。
5. Dynabeads (最終濃度 150 $\mu\text{g/ml}$) および上記抗体の濃度 (最終濃度 50 - 200 倍) になるように10 mM PBS で希釈し反応液とする。

5) 細胞と抗体結合ビーズの反応

1. 洗浄後固定細胞および抗体結合ビーズ反応液をEppendorf 型チューブ(容量 1.5 ml) で混合する。
2. 攪拌器(Rotator RT - 5 ; TAITEC) で室温、2 hrs.、持続的に転倒混和する。
3. ビーズに反応した細胞をMPC - E を用いてチューブ壁面に誘引する。
4. ビーズに未反応の自然沈下細胞および浮遊細胞を溶液共々吸引除去する。
5. MPC - E よりチューブを取り出し、磁力を解除、ビーズ反応細胞を回収する。
6. 回収細胞を通常の塗沫法ないしは Cytospin (Shandon) にてスライドガラスに塗沫し、95% エタノールで再固定する。
7. Papanicolaou、ギムザ染色し、顕微鏡下に細胞を観察同定する。

3. 結果

多数の非腫瘍細胞が混入しているような検体においても、上皮性細胞のみを認識する抗体を結合させたDynabeads を用いた方法で癌細胞のみを分離することが可能となった。Dynabeads は癌細胞の表面のみに付着するように存在し、細胞内に貪食されている様な所見は認められなかった (Fig. 1)。

基礎的検討においては、非腫瘍細胞に対し癌細胞が $1/10^{3-4}$ の割合の混在でも、癌細胞を分離することが可能であった。また、Dynabeads の付着が多く観察しにくい場合は、パパインなどの酵素処理によりビーズを剥がす事ができるので、その最適条件を検討中である。

4. 結語

- 1) 抗体吸着磁気ビーズを用いて液状検体から癌細胞を分離同定することを試みた。
- 2) 従来法である密度勾配法による細胞分離および免疫染色による同定法と比較し、本方法の利点としては下記の点があげられた。
 1. 操作が簡便である。
 2. 短時間で分離同定できる。
 3. 観察視野が狭く、短時間に鏡検できる。
 4. 細胞形態が保持されている。

5. 文献

- 1) Naib ZM. Exfoliative cytopathology. 3rd ed. Boston, Mass: Little Brown & Co. Inc;1985
- 2) Ruitenbeek T., Gouw A., and Poppenma S. Immunocytology of body Cavity Fluids: MOC-31, a monoclonal antibody discriminating between mesothelial and epithelial cells. Arch Pathol Lab Med 1994; 118 : 265
- 3) Imura G., Tumoraya M., Suzuki K., Manaka T., Iwaya Y., Fukunaga Y. and Igarashi S. Purification of tumor cells by the immunoseparation method from body fluid (Abstract) Acta Cytologica 1995; 39: 305.



Fig. 1 Cytospin preparation of adenocarcinoma cells after immunomagnetic separation of preural effusion from lung cancer patient.

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)593-3211【代】 FAX(03)593-3216