

Table. 1 Preparation pattern of micro-chamber by polymer coating and antibody immobilization.

Sample	MPC:nBMA:NVF (mol %) in feed	MPC content (mol %) in copolymer	Added NHS-PEG-Mal (mg)	Immobilization of antibody
1	30:60:10	22.8	37.5	+
2	"	"	12.5	+
3	"	"	0	+
4	40:50:10	36.0	37.5	+
5	"	"	12.5	+
6	"	"	0	+
7	Non-treated	Non-treated	0	-

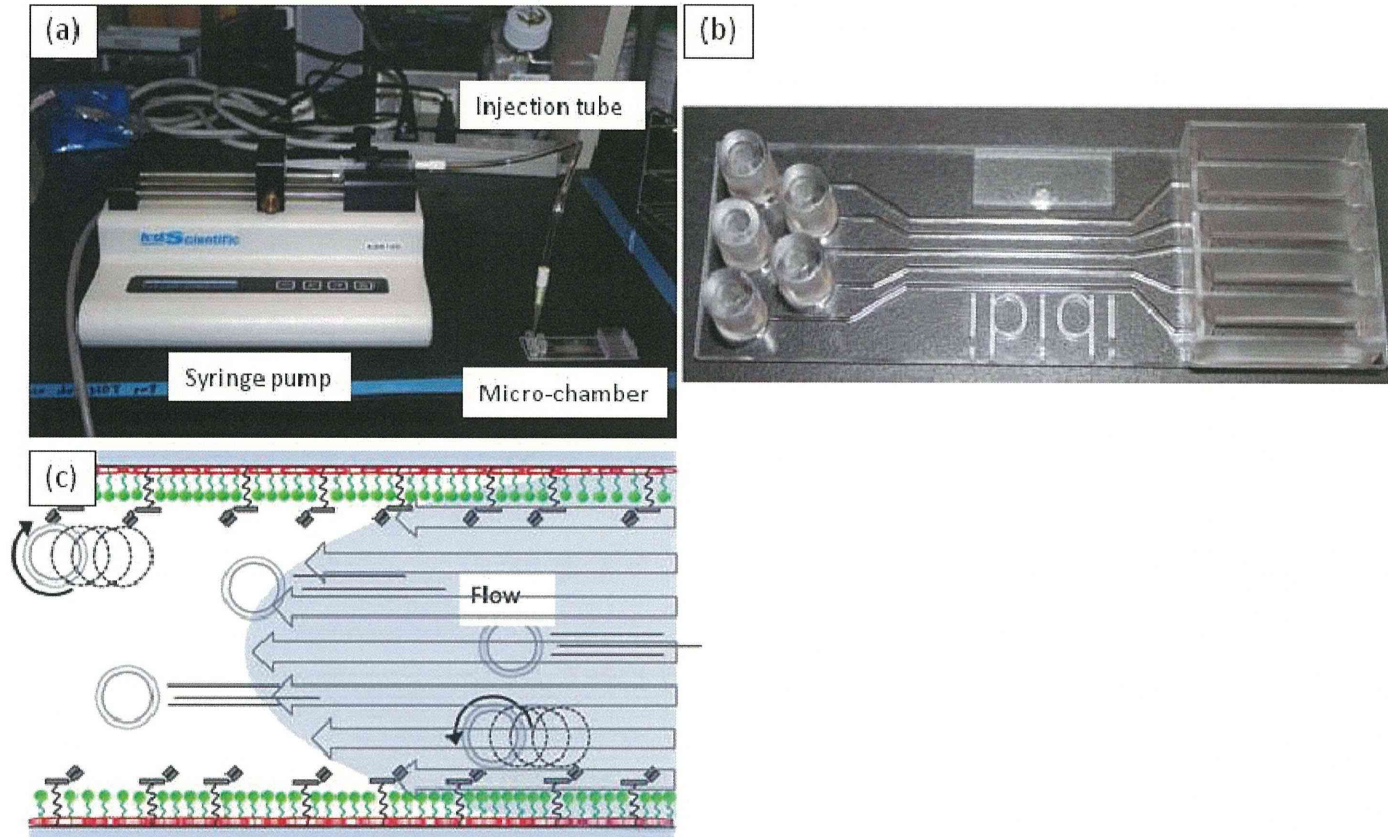


図3 (a) 市販のマイクロチップを用いた細胞分離システム。シリンジポンプにより流れをコントロールする。(b) 市販のマイクロチップの構造 (c) マイクロチップ内部を流れる細胞の様子。ローリング細胞、フローティング細胞、接着細胞の様子

Table. 2 Content of moving cells in chamber.

Sample	Cell behavior in the chamber (%)		
	Floating	Rolling	Adherent cells
1	45.7 ± 10.9	54.3 ± 10.9	0
2	52.2 ± 3.8	47.1 ± 2.6	0.7 ± 1.6
3	77.7 ± 9.7	22.3 ± 9.7	0
4	58.6 ± 10.6	40.7 ± 9.2	0.7 ± 1.5
5	56.8 ± 5.7	43.2 ± 5.7	0
6	88.5 ± 10.7	9.0 ± 10.0	2.5 ± 5.6
7	51.0 ± 5.0	4.2 ± 2.1	44.9 ± 4.8

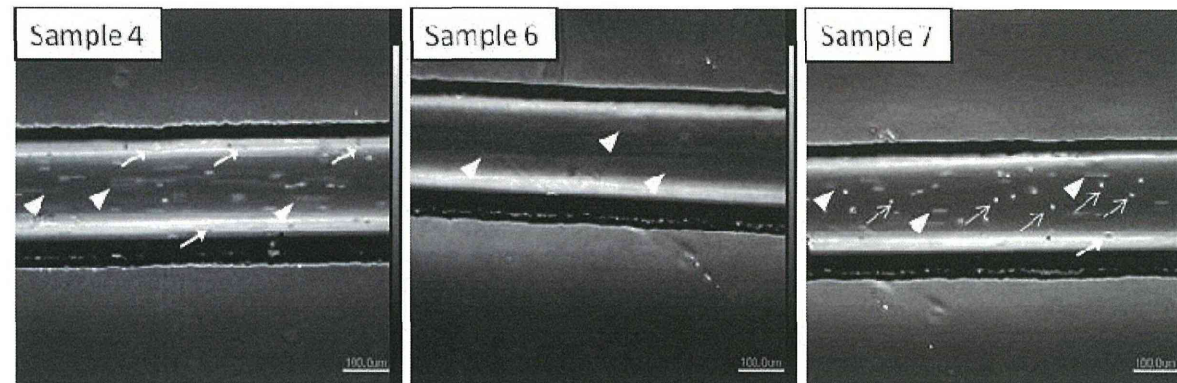


図4 各サンプルのコーティング剤で修飾した流路内部における細胞の様子。▲：フローティング細胞、➡：ローリング細胞：➡：接着細胞

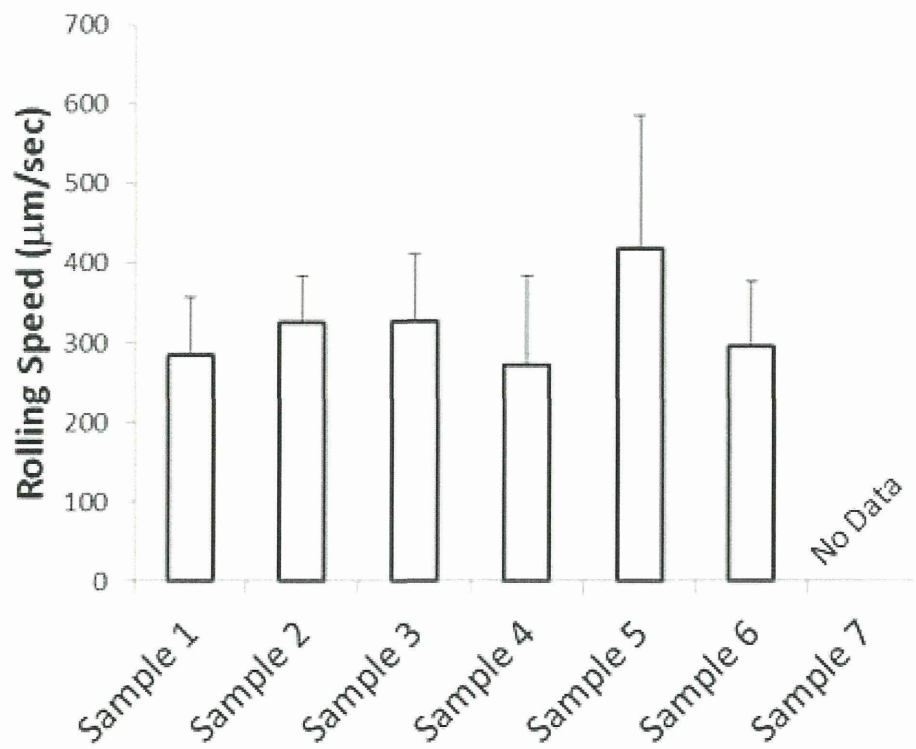


図5 マイクロチップ内を流れる細胞ローリングの速度

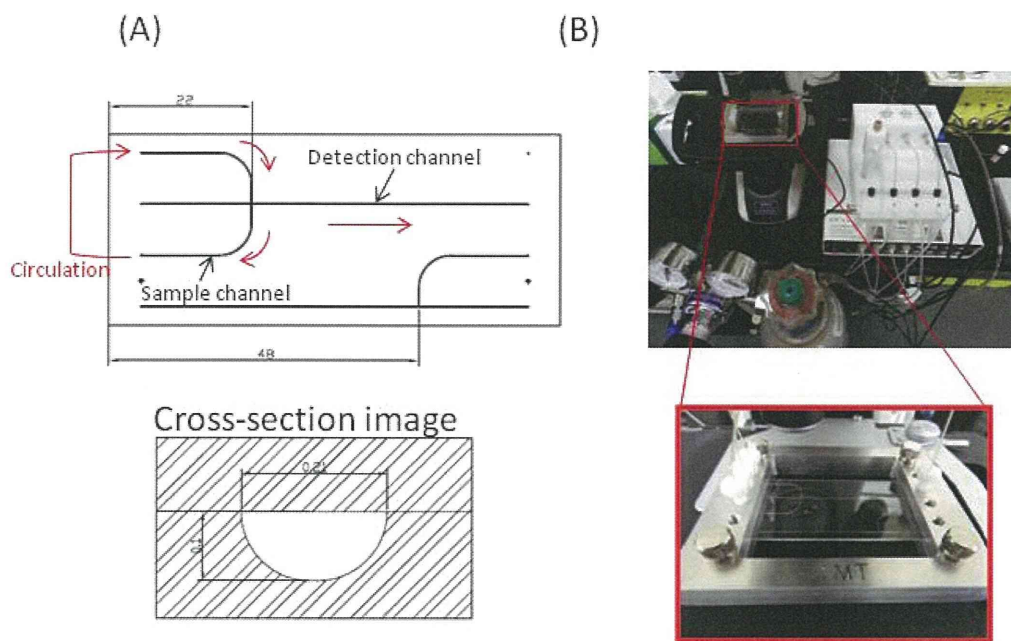


図6 (A) 交差型マイクロチップの設計図と、(B) 微量の流速がコントロール可能なポンプシステムを含むCTC検出用マイクロチップデバイスのプロトタイプ

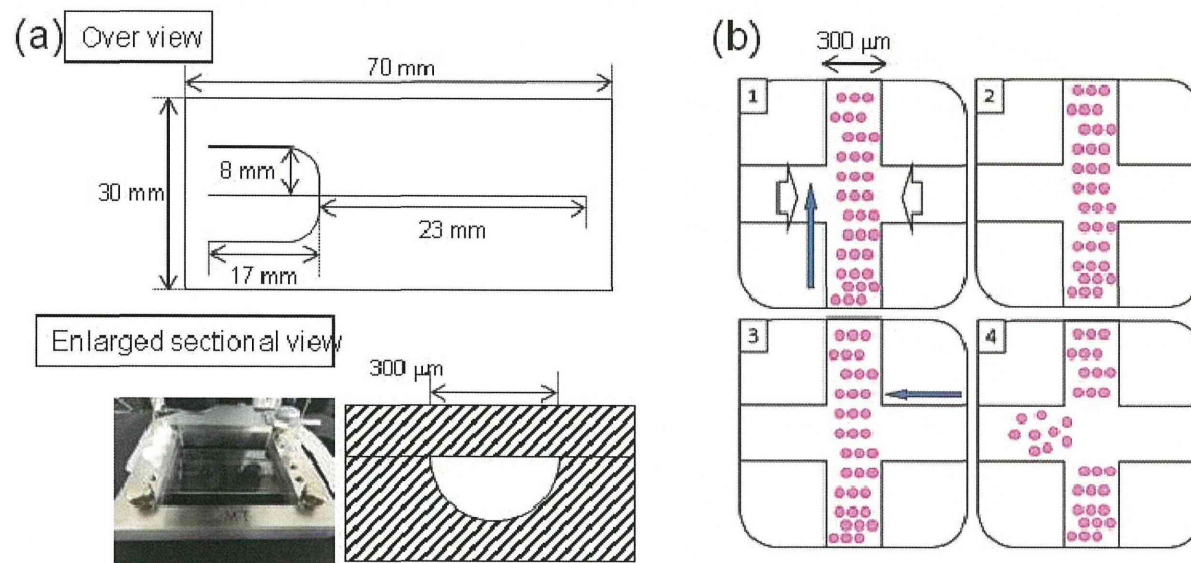


図7 (a) マイクロチップシステムのサイズと、(b) 細胞懸濁液を一定量インジェクトするための交差部分の機構

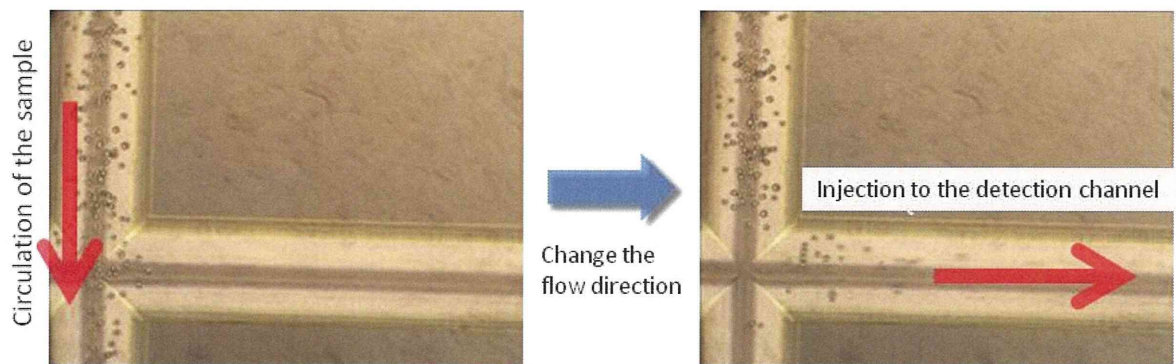


図8 交差型マイクロチップを用いて、検査用流路の方へ細胞懸濁液をインジェクトした時の様子

Table 3 Copolymerization of PMBV at 60°C for 6h

Sample	MPC: <i>n</i> BMA:VVF (mol%) in feed	$M_n \times 10^{-4}$	M_w/M_n	MPC content (mol%) in copolymer
1	30:60:10	3.97	1.27	19.8
2	30:60:5	6.45	1.12	38.3
3	30:60:1	4.74	1.08	31.0
4	30:60:0.5	5.32	1.11	20.6
5	30:60:0.1	4.31	1.18	21.5
6	30:60:0	3.21	1.10	23.3

Polymerization was carried out in ethanol using AIBN (0.5 mol%) as an initiator. Molecular weight was estimated by GPC (Standard pullulan) .

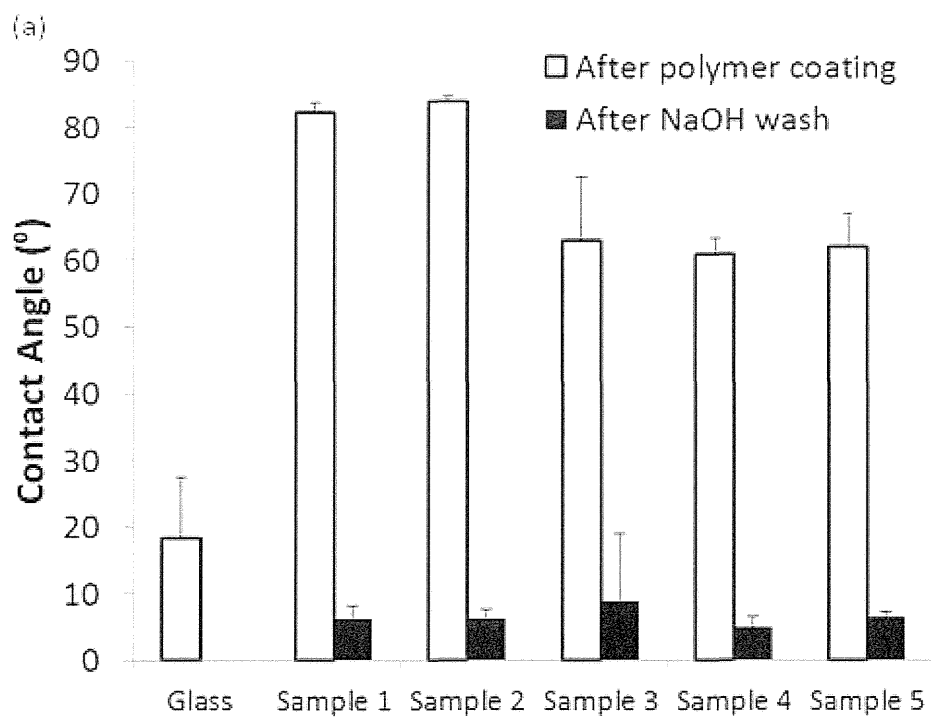


図9 PMBV をコーティングした水接触角測定の結果

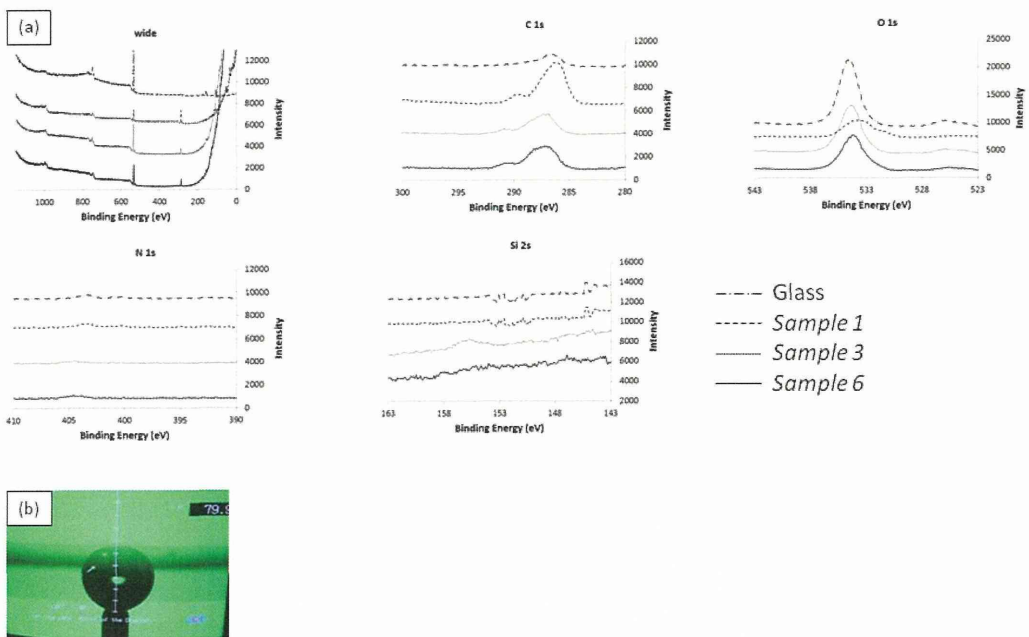


図 10 PMBV をコーティングしたガラス界面における X 線光電子分光の解析結果

Table 4 Element content of PMBV coated slide glass surface.

<i>Content(%)</i>	<i>NVA 10%</i>	<i>NVA 1.0%</i>	<i>NVA 0%</i>	<i>Glass</i>
<i>O/C</i>	0.954 ± 0.041	1.02 ± 0.03	2.53 ± 0.344	33.43 ± 12.58
<i>N/C</i>	0.0352 ± 0.002	0.04 ± 0.01	0.0608 ± 0.00179	0.211 ± 0.262
<i>P/C</i>	0.022 ± 0.004	0.02 ± 0.00	0.0355 ± 0.0197	0.081 ± 0.049
<i>Si/C</i>	0.030 ± 0.019	0.02 ± 0.01	0.604 ± 0.809	3.67 ± 0.730

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

マイクロ流路の構造設計と細胞ローリングの観察

分担研究者 山岡 哲二

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

研究要旨 循環がん細胞（CTCs）を検出するためのマイクロチップデバイスを構築するためには、活性を保持したまま、細胞ローリングを誘起できる界面の分子設計のみならず、細胞ローリングを効率的に誘起出来るような流路構造の設計や、さらには検体となる血液サンプルを一定量インジェクトできる機構を構築する必要がある。このような問題を解決するために、ガラス製の交差型マイクロ流路を構築してチップ内での細胞ローリング速度の解析をした。

A. 研究目的

循環がん細胞（Circulating tumor cell; CTC）は、がん患者の血中に存在し、転移に関わる細胞として知られている。本プロジェクトでは、細胞ローリングを基礎原理とするCTC検出用マイクロデバイスの開発を進めている。血中において、希少に存在するような細胞を高感度で検出するためには、細胞の非特異吸着を完全に抑制できるリガンド固定化剤の設計のみならず、ローリングを効率的に誘起するようなマイクロチップ構造も重要になる。予備的実験において、マイクロチップの深さやサイズが、細胞ローリングの効率に与える影響について検討しており、この結果を基にして、新たな交差型のマイクロチップ構造をもつCTC検出デバイスを開発した。さらに、このような微量な液量の流速をコントロールするためには、従来のよ

うなシリンジポンプタイプの送液構造では圧力損出が大きい。そこで、閉鎖系の流路構造を構築し内部に微量な圧をかけ、コントロールすることで、マイクロ流路内部の液体を動かし、さらにその圧力をコンピュータで制御できる構造を構築した。このような構造をもたせることで、検体となる血液を装置にセットし、コンピュータ制御によって細胞ローリングの検体を高速で複数回、インジェクトすることが可能となる。また、ガラス流路内部でローリングしている細胞の様子を、高速度カメラにて撮影し、ローリングの様子を直接解析した。これにより、内部で細胞が界面に接しながら回転運動している様子も確認でき、交差型のマイクロチップによって細胞ローリングを誘起できることを証明した。さらにモデル細胞を用いたローリング

細胞の定量についても検討した。

B. 研究方法

分担研究者によって設計された交差型の流路構造をもつマイクロ流路を用いて、細胞ローリングの直接観察と、モデル細胞を用いたローリング速度の解析を行った。詳細について以下に記述する。

1. ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路内での細胞ローリング挙動の観察とメカニズムの検証

マイクロチップ内において、ローリングしている細胞のみに、フォーカスを併せて、高速度カメラによって追跡した。これによって、細胞ローリング時の形状変化などからガラス界面において細胞自身が回転運動しているかどうかについて直接観察を試みた。

2. CTC 検査用マイクロチップシステムのプロトタイプを用いたモデル細胞のローリング速度解析

モデル細胞として、KG-1a (CD34 陽性) ならびに HL-60 (CD34 陰性) 細胞を用いた。これは血球系の細胞であり CD34 の有無が既に報告されていることから、この細胞を用いることで表面マーカーとローリングについて検討することが可能となる。

化学的安定性や、物質の非特異吸着性も抑制できるガラス製のマイクロ流路に対して、(幅 300 μm 、深さ 150 μm の交差流路)、ポリマーをコーティングし、antiCD34 抗体を固定化した。ローリング速度をコンピュータで定

量して、速度を解析した。

C. 研究結果

1. ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路内での細胞ローリング挙動の観察とメカニズムの検証

流路内に作製したポリマーをコートして、antiCD34 抗体を固定化し、KG-1a (CD34 陽性) 細胞を流路のスイッチングにより導入し、高速度カメラにより細胞ローリングの様子を追跡した。その結果、図 1 に示すように、細胞が液流により形状をわずかに歪ませながら界面を回転運動している様子が観察できた。連続的な界面への接触が観察され、設計通りに流路内部において細胞ローリングを誘起していることを証明することができた。

2. CTC 検査用マイクロチップシステムのプロトタイプを用いたモデル細胞のローリング速度解析

表面マーカーの発現に応じたローリング速度の解析をするために、MPC-nBMA-NVA のコーティングを介して、anti-CD34 抗体を固定化した界面を作製した。この界面に対して、KG-1a 細胞ならびに HL-60 細胞をインジェクトして、細胞ローリングの速度を定量した。その結果を図 2 に示す。抗体固定化量の増加に伴って、ローリング速度の差は大きくなり、最大で 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の差を示した。具体的には、KG-1a 細胞において 40 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であるのに大して、表面マーカーを発現していない HL-60 細胞では平均速度が 50 $\mu\text{m}/\text{sec}$ となり有意な差が示された。

また、交差流路から、一定の細胞懸濁液を一定量、検査流路へと誘導できることも確認できた。

D. 考察

設計したガラス製のマイクロ流路を用いることで、直接細胞ローリングの様子を捉えることができた。これにより内部で起きている現象を確認でき、細胞ローリングの機構により評価できることが証明された。また、交差型の流路より実際にモデル細胞を用いた結果、ローリング速度の定量により細胞のフェノタイプを識別することが検証できた。抗体密度による速度の変化についても、リガンド界面と細胞表面との相互作用の結果であることを支持するデータであり、これらのデータを含めて、CTC 細胞検出デバイスとしての基礎的な性能を検討する事ができた。このようなデータを基に、来年度は米国 FDA で認可されている CTC 検査装置の標準サンプルを用いて、検出感度の定量をすすめる。市販の装置との性能の比較もでき、客観的な指標がえられるものと考えている。

E. 結論

交差型流路をもつ CTC マイクロチップのプロトタイプを構築することができた。本プロジェクトの実験計画をほぼ予定通り達成しており、最終年度へ向けた CTC 検出装置の性能評価に向けて基盤技術が整った。今後血液検体なども含めて検出感度について評価

する。

F. 健康危険情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Efficient cell rolling for adipose derived stem cell purification on antibody-immobilized microfluidic chamber with amphiphilic phospholipid polymer coating, submitted

2) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Vertical crossed micro-chamber for cell rolling column to lead definite cell rolling, in preparation.

2. 学会発表

1) Hao CHEN, Atsushi MAHARA, Carlos AGUDELO, Hiromi KITANO, Tetsuji YAMAOKA, Development of cell rolling column modified with betain polymers,第62回高分子討論会(名古屋)(2012)「国内学会、口頭発表」

2) Atsushi MAHARA, Kristi L KIICK, Tetsuji YAMAOKA, Elastin-like polypeptide hydrogel for vascular tissue reconstruction based on the guided-tissue regeneration, ACS fall meeting (Philadelphia, USA) (2012)「海外学

会、ポスター発表」

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし

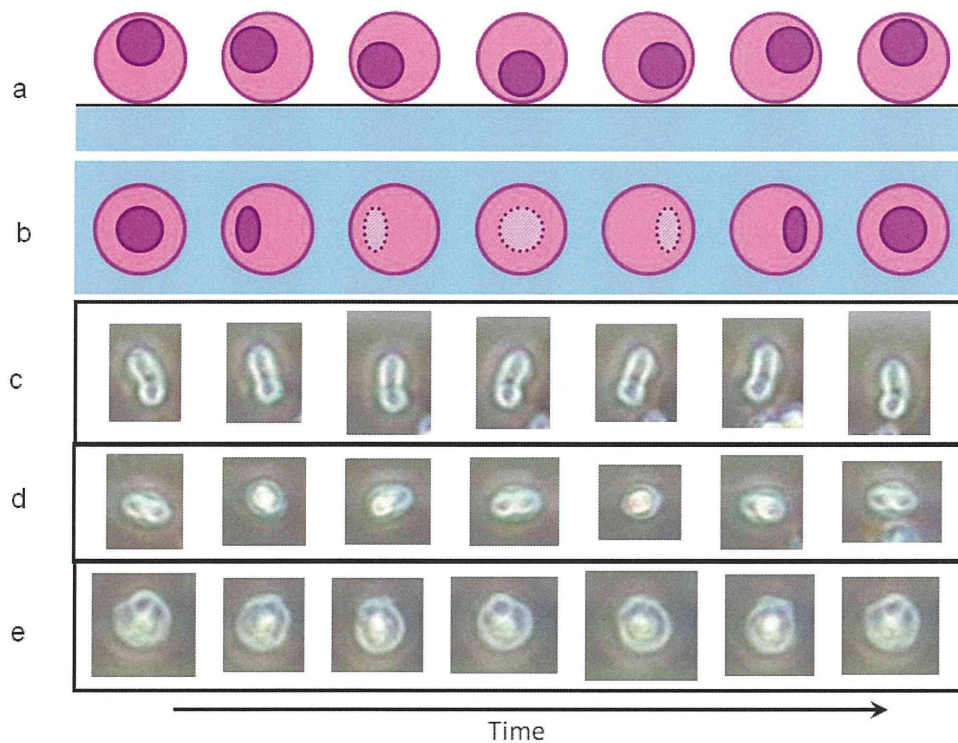


図1 (a) チップ内部の細胞ローリングを横から観察したときの図、(b) チップ内部の細胞ローリングを上から観察した時の図 (c-e) マイクロチップ内部で観察された細胞ローリングの様子 (上から見た様子)

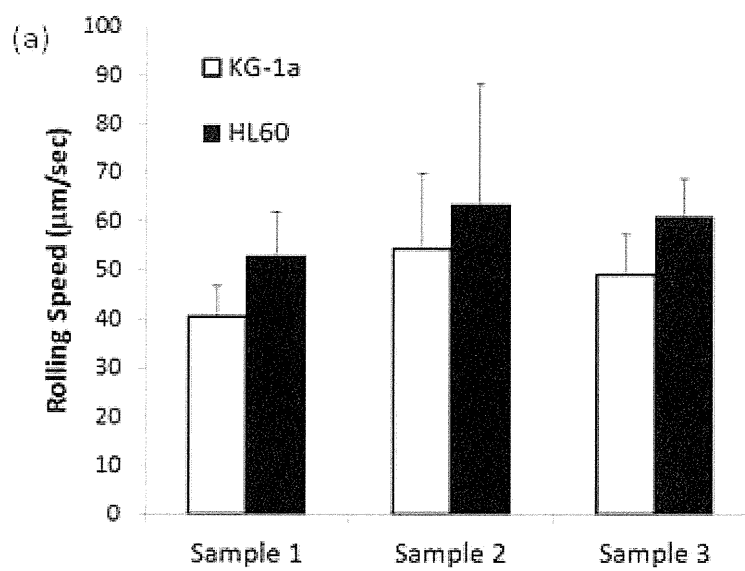


図2 3種類のポリマーでコートされた流路内部におけるKG-1a細胞とHL-60細胞のローリング速度の定量結果

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T	Efficient cell rolling for adipose derived stem cell purification on antibody-immobilized microfluidic chamber with amphiphilic phospholipid polymer coating	Biotechnology and Bioengineering	submitted		
Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T.,	Vertical crossed micro-chamber for cell rolling column to lead definite cell rolling	Preparation			

学会発表

演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
Hao CHEN	Development of cell rolling column modified with betain polymers	第62回高分子討論会	名古屋	2012年9月19日-21日
Atsushi MAHARA	Elastin-like polypeptide hydrogel for vascular tissue reconstruction based on the guided-tissue regeneration	ACS fall meeting	Philadelphia, USA	2012年8月19日-23日
馬原 淳	再生医療の実用化を目指した循環器疾患に対する新たな医療デバイスの開発、	北陸先端科学技術大学院大学 藤本研究室セミナー	石川	2012年10月20日
馬原 淳	ソフト界面の構築に基づく新たな医療デバイスの開発～細胞分離カラムと小口径人工血管の開発	ソフトインターフェースの分子科学 武田研・吉本研 Joint Seminar 2012	東京	2012年12月21日