

201313059A

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

リガンド固定化マイクロデバイスによる

循環がん細胞診断デバイスの開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成26(2014)年 4月

別添1

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

リガンド固定化マイクロデバイスによる

循環がん細胞診断デバイスの開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成26（2014）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
リガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞 診断デバイスの開発	----- 1
馬原 淳	
II. 分担研究報告	
1. 交差型マイクロ流路による循環がん細胞診断装置の プロトタイプの開発と解析アルゴリズムの検討	----- 9
馬原 淳	
2. 開発した循環がん細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) 診断 装置による細胞のヒストグラム解析とCTC標準サンプルの計測	----- 24
山岡 哲二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

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）
総括研究報告書

リガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞診断デバイスの開発

研究代表者 馬原 淳

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 本研究課題は、がん転移メカニズムにおいて重要な役割を果たす循環がん細胞（Circulating Tumor Cells ; CTC）を早期に診断するリガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞診断デバイスを開発している。平成24年度までに、非特異吸着を抑制してターゲット細胞を効率的に捕捉する界面の構築に成功し、その界面でのローリング挙動について解析を進めた。最終年度である25年度は、デバイスの組み上げとシステムの構築を目指して、ハードウェアとしての診断デバイスの作製、データ解析の為に動画処理アルゴリズムの検討、ならびに標準試料を用いた細胞ローリング速度解析を試みた。

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・部長

A. 研究目的

転移がんの発症メカニズムとしてその存在や転移挙動が解明され始めている循環がん細胞（Circulating Tumor Cells ; CTCs）は、がん転移という臨床において極めて重大なイベントのメカニズムであり、その早期検出は、がん患者の生存率や、治療方針に対して大きな影響を及ぼす。このような観点から、米国ではすでにマグネットビーズや免疫染色などの従来の手法を組み合わせた原理をもつ診断デバイスが米国食品医薬品局（FDA）認可のもとに製造販売が進められており、循環がん細胞の診断は研究のみ

ならず一般的な臨床現場においても普及が始まっている。また、本国においても、その診断の重要性が認知され始めており、マイクロチップ技術のみならず、ターゲットとなる細胞の詳細な同定など様々な観点から研究が進められている。

一方で、この循環がん細胞の存在率は極めて低く、高感度で検出する手段が確立していないのが現状である。このような中 1998年、University of Texas Southwestern Medical Center の Uhr らのグループは、血中にある CD44 陰性、Cytokeratin 陽性の細胞をフローサイトメトリーで検出し評価することにより、転移がんの早期発見、病状の診断、予後判定において極めて有用であることを報告した。血中に存在する CTC は、 10^9 個のう

ち1個程度の割合の割合で存在しており、血中における半減期が3時間程度であることが知られている。このような観点から、従来法のようにラベル化した細胞集団を分析するような手法では、数個の細胞の診断は難しい。このため、個々の細胞をラベルフリーで高速に診断できる技術は、割合が極めて低い細胞集団の検出において有用であると考えられ、それらの要素技術の創出は、今後の循環がん細胞診断技術において有効である。

我々のグループは、これまでに細胞ローリングという固定化リガンドと細胞表面との間で惹起される一時的な相互作用を利用した細胞ローリング現象に着目し、この原理を利用したラベルフリーの細胞分離システムの構築を進めてきた。ヘテロな細胞集団として広く認識されている間葉系幹細胞を表面マーカーの有無のみならず、その密度によって分離することを既に報告し、この基礎技術に関する項目についてはすでに特許出願済みである。リガンドが固定化されている分離カラムへ細胞懸濁液を通液することにより、リガンド界面で細胞表面マーカーが一時的に結合し、カラムへの送液で細胞へシェアストレスを付与することにより、細胞ローリング現象が誘起できる。我々の体内においてもこの細胞ローリング現象は存在し、血管内皮細胞が提示するリガンド（固定化リガンドに相当）と白血球が提示するリガンドとが相互作用することで、血管から炎症部位へと血球が効率よく

輸送するメカニズムである。これは、白血球ホーミング現象として知られている。この回転速度や輸送効率、内皮細胞が提示するリガンド密度によって制御されていることが知られており、緻密なローリング速度の制御が達成されている。この原理をカラムへ応用した場合、固定化リガンドの密度を一定に保持することで、細胞のマーカー分子の発現密度が異なる集団を細胞ローリング速度の違いとして認識でき、分離が達成される。

一方で、本研究課題である循環がん細胞の転移現象も、このような細胞ローリング機構により精密に制御されていることが明らかとなってきた。循環がん細胞が他の組織に転移する場合には、細胞ローリングという機序を利用することで、転移巣を形成する。つまり、循環がん細胞の細胞ローリングという機序は、CTC細胞の同定のみならず、転移を起こしやすい細胞なのかどうかを判別するためにも極めて良い指標ではないかと考えている。本プロジェクトでは、細胞ローリングという原理によって循環がん細胞を診断する為のデバイスを構築することで、転移に係わる循環がん細胞を効率的に検出・診断できるのではないかと考えている。

上記のような視点に基づいて、細胞ローリングカラムの原理を応用・展開したマイクロチップシステムを構築することができれば、循環がん細胞の検出を、「細胞ローリング」という新たな視点によって高感度で検出・診断

できるのではないかと考えている。初年度から昨年度までに、循環がん細胞を高感度で検出するためのマイクロチップの構造や、抗体を固定化するためのコーティング剤の開発など、基礎的な検討を主に進めてきた。同時に、培養細胞を用いて、コーティング剤の有効性や、細胞ローリングを効率的に誘起するためのマイクロチップ構造の検討と評価を進めてきた。このような状況を踏まて、最終年度となる平成25年度では、これまでに構築した基礎技術を結集し、循環がん細胞検出装置のプロトタイプを構築した。また、検出・評価システムの解析ソフトウェアも検討することで、マイクロチップ内で流れる細胞のローリング速度を定量的に解析できるアルゴリズムの最適化に着手した。プロトタイプならびに、解析ソフトのアルゴリズムの最適化を実施した後に、マイクロチップ内部に加圧する圧力と粒子のローリング速度の相関についても詳細に検討した。このような実験から、本プロジェクトで目指していたリガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプを創出することができた。さらに、構築したプロトタイプを用いて、細胞の流速分布の解析を試みた。また、現在米国 Veridex 社の開発した Cell Search システムの標準サンプルを用いて、マイクロ流路内での固定化細胞の非特異吸着の抑制効果やローリング観察についても検討し、装置としての有効性について検討した。

B. 研究方法

1. マイクロチップによる循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築

細胞ローリングを診断するため交差型流路内の微量な液流を制御できる微量送液システムとして、Fluigent 社製の Microfluidics Flow Control System (MFCS) を採用した。この装置に、PEEK 製のマイクロチューブを接続して、金属の枠で固定したマイクロチップへ接続した。このチップをニコンの顕微鏡ステージ上に乗せ、デジタルカメラによって細胞や粒子の流れる様子をリアルタイムで記録した。実験後、撮像された動画ファイルを、動画解析ソフト（2次元動画計測ソフト「Move-tr/2D」：株式会社ライブラリー）で解析し、流速や速度分布について評価した。

2. ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの構築

顕微鏡により得られた細胞ローリング動画の解析については、株式会社ライブラリーの動画解析ソフト 2次元動画計測ソフトを用いて、アルゴリズムを検討した。アルゴリズムを検討する場合には、流す細胞の形状などの影響を無視して評価することが望ましいので、細胞と同程度のサイズである $10\mu\text{m}$ のラテックス粒子を用いた。アルゴリズムについては、得られた画像から、すべての動画の平均値画像を取得し、その平均値の画像を、すべての動画から差分することで、動的な画

像の要素だけをより鮮明に抽出することとした。その後、画像のコントラストや輝度などの調製をすることで、動いている成分のみをコンピュータ上で抽出した。

3. マイクロチップ内における加圧条件と粒子速度の分布解析

マイクロチップ内に印加するための圧力条件を検討した。横軸にマイクロチップ内にかかる input channel と output channel の圧力差をとり、縦軸には、画像解析により得られた粒子のローリング速度をプロットした。また、細胞の大きさを考慮して、粒子径に対する加圧条件を検討するために、 $10\mu\text{m}$ の粒子と $20\mu\text{m}$ の粒子について同様の実験を実施した。

4. 培養細胞を用いたプロトタイプシステムによる速度分布解析

2) において検討したアルゴリズムの検討に基づいて、流路内に流れる細胞の速度のヒストグラムプロットを実施した。細胞は、ラットの脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。ラットの腹部の脂肪を採取して、ミンスした後、トリプシン溶液にミンスした組織を浸漬し、 37°C でインキュベートした。その後、上清を回収するために遠心分離によりミンスした組織を除去し、培養皿へ播種して、細胞培養用のインキュベータで静置した。増殖した細胞成分を継代し実験に使用した。この細胞を脂肪組織由来の間葉系幹細胞として実験で使用した。

5. CTC 標準試料を用いた細胞ローリングの観察

米国 Veridex 社から販売されている CellSearch システムの測定確認や補正に用いられている標準サンプルを購入し、その固定化細胞を用いてマイクロチップシステム内での細胞の速度計測についての可能性を検討した。

C. 研究結果

各項目における結果の概要を記述する。詳細については、分担研究報告書において記述する。

1. マイクロチップによる循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築

Fluigent 社製の Microfluidics Flow Control System (MFCS) に対して、PEEK 製のマイクロチューブを接続してマイクロチップの流路を加圧した。PEEK 製のマイクロチューブを用いることで、チューブでの圧力損出もほとんど見られなかった。また、圧力をソフトウエアで切り替えることで、迅速に流路内部での粒子の動きを制御できていることから、接続部などの圧力の漏れや、損出も実験系に対して無視できる程度であると考えられる。

2. ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの構築

得られた動画において、動的成分のみを抽出してその速度解析をすることは、極めて難しく画像処理や演算の

実施が必要であった。最終的に、すべての動画に含まれる画像成分を時間内において平均化し、その画像を演算で作製した。その後、動画内に含まれるすべての画像から、演算により得られた画像成分を差分することで、動きのある成分のみを効率的に抽出することに成功した。さらに、画像内にある細胞成分と、他のノイズ成分との識別を実施するために、画像の2値化により動画成分の中のピクセル数が粒子サイズと一致するものに対してのみ、動的成分の追跡を実施するようなアルゴリズムとした。さらに、動画内において新たに出現するローリング細胞成分の識別については、本ソフトウェアに付属の自動識別機能により追跡することとした。細胞ローリングの画像は、連続して細胞が出現し、画面外へと流れていくために、本機能を用いることで、粒子が新たに出現した場合でも、閾値の設定によって効率的にターゲット細胞成分のみを識別することが可能であった。このような細胞ローリングの動画解析におけるアルゴリズムを固定することで、サンプルによるデータ解析のばらつきを一定にすることができ、より客観的で定量的な評価系を構築できるものと考えている。

3. マイクロチップ内における加圧条件と粒子速度の分布解析

マイクロチップ内での加圧とそれに伴う液流のずり応力に対する粒子の速度をプロットした。その結果、粒子サイズ（細胞を想定しているために、

10 μm と20 μm のラテックス粒子を使用)を用いた場合でも、有意差なく同程度の速度変化を示すことが明らかとなった。また、流路の中央部やエッジ部などの場所による流速の違いも観察されたが、その誤差を考慮してプロットした場合でも、マイクロチップ内部の印加圧力変化に応じて、粒子の速度は連続的、直積的に変化していた。これらの結果より、マイクロチップ内部に印加する圧力を連続的に変化させることで、液流のずり応力に応じて細胞ローリング状態を精密にコントロールできることが示された。この条件にもとづいて、リガンド固定化された界面での細胞ローリングの最適条件（抗体の固定化密度に対する細胞へのずり応力の条件）を検討できるものと考えている。

4. 培養細胞を用いたプロトタイプシステムによる速度分布解析

取得していた画像データに対して、2)で検討したアルゴリズムにより細胞の速度分布をプロットすることができた。得られたヒストグラムは、横軸がローリング速度あるいは、フローティング速度であり、縦軸は細胞の個数を表すヒストグラムである。得られたヒストグラムは大きく分類して、3つの群に分かれる。1つは細胞が流路中をFloatingしている状態での速度として考えられる群であり、もう一方は、界面をローリングしている細胞群である。この細胞ローリングしている群の中でも、2つにピークが別れており、

最も大きな分布を持っていたのは、メジャー成分である細胞ローリング速度をもつものであり、もう1つはマイナー成分である Low velocity cell 群に分類される細胞成分である。このような細胞成分の分布をヒストグラムから識別することが可能であることが見出された。今後、このようなヒストグラムを様々な条件（リガンドの固定化状態やその密度、さらには細胞に与える圧力）に対してプロットし、モデル細胞を用いて効率的に Low velocity cell 群を診断することができる条件を見出すことが重要になる。

5. CTC 標準試料を用いた細胞ローリングの観察

米国 Veridex 社から販売されている CellSearch システムの標準サンプルを用いて、マイクロ流路内における細胞の挙動をカメラによって観察した。その結果、構築したプロトタイプの装置系やソフトのアルゴリズムを用いても十分に細胞成分の識別が可能であった。この標準試料の速度分布解析をすすめることで、上市されている診断装置との比較が容易になるものと期待している。

D. 考察

最終年度となる 25 年度では、これまでの研究により得られた材料やマイクロチップの構造などすべてをプロトタイプに組み込み、初年度において目標としていた細胞診断デバイスの開発にまで到達することができた。圧

力コントロールによるマイクロチップ内での細胞ローリングの制御という観点からは、従来装置ではない特徴であり、今後の装置の汎用化を目指した場合でも小型化に対応できる基本設計である。また、幅 $300\mu\text{m}$ 、深さ $150\mu\text{m}$ のサイズをもつ交差型マイクロ流を用いた場合でも、全く圧力損出することなく、粒子の速度を圧力条件のみで精密に制御できた。これは、従来までのシリンジポンプによる装置径では、圧力損出が大きすぎて装置設計あるいは現実化が難しかった。この装置系の選定と交差型のマイクロチップを使うことで、一定量の細胞を検査流路へと流すことができ、またその速度分布も流路内部の場所依存性も少なく細胞ローリング速度を計測できた。流路サイズをより小さいものに変更した場合には、細胞の詰まりなどの原因になり、一方で流路を広くとった場合には、速度のバラ付きが大きくなり、検出感度の低下につながりかねない。今回、加圧条件と速度分布についても定量的にヒストグラムを描写し解析した場合でも、懸念していたような分布のばらつきは認められなかった。これは、加圧条件と流路サイズの最適化により見出された条件であると考えられ、今後の細胞実験においてもこの条件を基本として検討を進めていきたい。

画像解析においてもマイクロチップ形状に由来するバックグラウンドノイズが大きな問題であった。Raw data の動画をそのまま細胞速度解析

を実施しても、認識効率が極めておろく、まったく細胞速度分布がプロットされなかった。動画の平均化という手法を用いることで、バックグラウンドノイズを効率的に消去できたことで、ソフトウェア上での速度分布解析が実行できるようになった。このアルゴリズムのみならず、さらに高精度な粒子認識処理技術を用いることで、リアルタイムでの速度分布の描写も可能ではないかと考えており、今後の装置化における検討課題にしたいと思っている。

E. 結論

最終年度である 25 年度では、プロジェクトの最終目標であった、リガンド固定化マイクロデバイスを用いた循環がん細胞診断デバイスの開発に到達することができた。設計して実験を進める中で、検出感度が大きな問題となりそれに対して、界面にリガンドを固定化するためのコーティング剤に大きく時間を割いたが、非特異吸着の完全な抑制が可能なこのコーティング剤によりマイクロチップ内部での細胞ローリングを高感度に検出できる可能性が見出されてきた。この 3 年間の研究開発で、十分な成果というところまでは至らなかったが、装置のプロトタイプ構築や、細胞ローリングによる検出デバイスにおいて問題となる様々な要素技術や基礎的問題的を見出すことができたのは、今後の展開を考える上でも大変意義深いと考えている。米国 FDA 認可の装置の標準サン

プルでの実験実施についても、標準化された系や、これまでの既存の技術との比較という点においても必ず実施しなければならない点であると認識して、プロトタイプでの評価へと進んだ。実際の検体を使った評価や、患者の病態と本装置系で検出される循環がん細胞の個数との相関評価など、まだまだやり残した点は多くあるが、今後は産学官連携のプロジェクトにより本装置を開発製造できるような企業と連携し、基礎技術を展開することで、本邦独自の転移がん検出装置システムを創成出来るものではないかときたいしている。

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) Mahara A., Chen H., Ishihara K., Yamaoka T., Phospholipid polymer-based antibody immobilization for cell-rolling surface in a system for stem cell purification. J Biomater Sci, under revise process

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

2. 学会発表

該当なし

1) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Circulating tumor cell detection system on cell rolling microchip, The 15th International conference on biomedical engineering (Singapore) (2013) 「海外学会、口頭発表」

2) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Cell-rolling microchip for the detection of circulating-tumor cells (PMSE session, Oral presentation), ACS fall meeting (Indianapolis, USA) (2013) 「海外学会、口頭発表」

3) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Cell-rolling microchip for diagnosis of peripheral circulating cells such as CTCs (PME session, Poster presentation), ACS fall meeting (Dallas, USA) (2014) 「海外学会、ポスター」

4) 馬原淳、陳 顥、カルロス アグデロ、石原 一彦、山岡 哲二
細胞ローリングを利用した細胞診断用マイクロチップの開発 文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究「ソフトインターフェースの分子科学」(東京大学・東京)「国内講演、ポスター発表」

H. 知的財産権の出願・登録情報

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

リガンド固定化分子の設計と界面における
非特異吸着・細胞ローリング挙動の解析

分担研究者 馬原 淳

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 リガンド固定化マイクロデバイスを用いて、細胞ローリング応用した新たな細胞診断デバイスを開発することが本プロジェクトの目標である。最終年度である25年度では、これまでに開発したリガンド固定化技術や、マイクロチップ、さらには、流路内部の流速を微量に変化させることが可能なマイクロポンプとを組み合わせ、診断デバイスのプロトタイプ構築と、細胞ローリングの解析ソフトウェアのアルゴリズム設計、さらには、これらを用いた速度解析について検討した。

A. 研究目的

非特異吸着を抑制した界面に対して、リガンドを固定化することで、リガンドの選択性がさらに向上して、非特異的な吸着に由来するノイズ成分が除去できる。昨年度までに構築したリガンド固定化剤は、タンパクや細胞の非特異吸着を抑制するためには、極めて有効に機能することがすでに見出されており、最終年度となる25年度での研究においても、MPCを基礎骨格したポリマーをリガンド固定化剤として用いた。循環がん細胞は、血中を流れるがん細胞として知られており、その転移過程では血管内皮細胞上を細胞ローリングしていることが知られており、生着して増殖することで、いわゆるがんの転移が発現する。しかし、この転移に関わっている細胞は、

血中において極めて少数であることが知られており、循環がん細胞の検出は、この少ない細胞ポピュレーションをいかに効率よく検出するか、ということが大きな問題となっている。このような観点からも、開発したリガンド固定化剤は、検出デバイスの表面修飾法として極めて有効であることが考えられる。しかしながら、一方でこのような表面処理剤のみでは、特定のターゲット細胞のみを高感度で検出することはできない。すなわち、検出に必要なチップデバイスであったり、そのチップデバイス内部での細胞のマニピュレーション技術であったり、さらには、その細胞を高感度で捉えるためのカメラシステム、とらえた画像を処理して、ローリングしている細胞成分のみを抽出するための、ソフトウ

エアやアルゴリズムの開発も、重要になる。最終年度である平成25年度では、これまでに構築してきたリガンド固定化剤やマイクロチップ設計などすべての技術を統合して、細胞ローリング速度を診断するデバイスシステムの構築を大きな目標とした。さらに、得られたデータを定量的に取り扱うことは、診断において重要であることから、動画解析ソフトやアルゴリズムの評価により、細胞ローリング速度の分布解析も実施した。以下に実施した詳細の実験・検討項目について記載する。

B. 研究方法

1. マイクロチップによる循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築

昨年度までに設計した幅 $300\ \mu\text{m}$ 、深さ $150\ \mu\text{m}$ の構造をもつ交差型マイクロチップを用いた。マイクロチップを金型の枠で固定し、マイクロチップの流路に対して、PEEK 製のマイクロチューブを接続することで、ポンプシステムからの圧力を流路内へと接続した。微量な液流を制御するための微量注射システムとして、Fluigent 社製の Microfluidics Flow Control System (MFCS) を採用した。また、構築したマイクロチップ内部の様子を観察するために、ニコンの位相差顕微鏡のステージにチップを設置し、その上部から、デジタルカメラによって細胞や粒子の流れる様子をリアルタイム

で記録した。流路については、交差型のマイクロ流路として、検体となる細胞懸濁液を循環させるための流路と、細胞ローリングを計測するための流路からなる。交差部分の懸濁液をチャンネルを切り替えることで検出流路へと導入し、一定量の細胞で細胞ローリングを観察した。その領域を CCD カメラで撮像して、動画解析を実施した。

2. ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの構築

動画の解析については、株式会社ライブラリーの 2 次元動画計測ソフト「Move-tr/2D」を用いて、撮像された細胞ローリングの動画を解析した。画像解析において重要な点であるローリング細胞の抽出については、画像の差分処理によりノイズを除去する手法を採用した。動画で撮像されたすべてのフレーム中の画像の平均画像を演算し、その後すべてのフレームから平均画像を差分したものを解析用画像とした。その個々のフレームの画像から再び動画を構築して、解析用動画とした。さらに、輝度やコントラストの調製をして、その後の二値化やローリング細胞の認識に用いた。二値化によりコントラストがあるローリング細胞成分のみを抽出し、ソフトウェアによる自動識別によって各フレームから移動する速度を算出した。

3. マイクロチップ内における加圧条件と粒子速度の分布解析

1) で構築した装置系において、液

流のずり応力に対する細胞の移動速度の相関を調べることで、ポンプシステムやマイクロチップ内での細胞ローリングの制御の精度の評価ができる。マイクロポンプにより加圧される圧力と、流路内部での液流の速度について、ラテックス粒子（ポリサイエンス社製）を用いて評価した。ラテックス粒子のサイズについては、 $10\mu\text{m}$ と $20\mu\text{m}$ の2種類を用いた。これは、細胞を評価対象としているために、細胞のサイズと同程度の範囲内で評価することが目的であった。マイクロチップの Input channel と Output channel に対して、圧力差を生じさせ、その圧力差に対して、粒子の流れる速度をプロットした。

C. 研究結果

1. マイクロチップによる循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築

図1に交差型マイクロ流路の設計図を示す。流路幅は $300\mu\text{m}$ として、深さは $150\mu\text{m}$ とした。マイクロチップの外観は図2に示す。この程度のサイズにより、インジェクトした細胞同士のアグリゲーションによる詰まりを防ぐことができた。また、流路は2つあり、1つは細胞検体を流すサンプル流路であり、もう1つは細胞懸濁液を流して細胞ローリングを評価するための検出流路になる。この2つのチャンネルを交差させ、交差部分にある細胞のみを検出流路へとインジェクす

ることで、一定量の細胞のみをインジェクトできる。

循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの全体像を図3に示す。3つのユニットから形成されており、顕微鏡ユニットには、対物レンズとして位相差顕微鏡用レンズ、上部にはCマウントを介して、動画取り込み用カメラを配置した。図2のマイクロチップから接続されたPEEK製のマイクロチューブは、図3中央にあるマイクロポンプ上にあるサンプルポートへと接続した。このサンプルポートには流速を測定するためのユニットが配置されており、印加された圧力のみならず、検出器でモニターできる流速データを採取できる。

図3右側に配置しているコンピュータにより、マイクロポンプにかかる各チャンネルの圧力を制御した。デジタル制御であり、さらに経時的に圧力をプログラミングできることから、今後の解析システムの構築においても大変有用なシステムであった。装置のプロトタイプの構築については、この形を本プロジェクトの最終的な成果として位置づけたいと考えている。今後、さらなる改良により検出器感度やポンプ精度を向上させること可能であるが、産学連携のプロジェクトにより汎用性のあるシステムへと組み上げていくアプローチが必要であり、プロトタイプで培った細胞ローリングシステムの問題点等を反映させていきたい。

2. ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの構築

動く細胞成分のみを抽出するには、画像解析に関連した研究において様々なアプローチがされている。例えば、前処理行程では、平滑化、強調や平滑化兼強調などといったフィルター処理や、背景差分法とよばれる画像のバックグラウンドを差し引く行程もある。さらには、濃度変換とよばれる一般的な輝度やコントラスト調整から、アフィン変換などといった動画の位置を平行移動、回転、縮小拡大などの手技もある。本システムで得られる細胞画像について種々の条件で二値化による最適抽出方法を検討した結果、図4に示すようなアルゴリズムが最適であった。

まず、得られた Raw data をすべての構成画像へと分割し、すべての画像から平均画像を算出させた。この画像では、静止している部分の画像情報のみが平均化され残存するので、動画成分以外のデータが含まれることとなる。この平均化された画像を用いて、Raw data から各フレームのデータを差分して得られた画像を、さらに再構成することで解析用の動画を得た。これは、静止画で得られるデータを完全に除去することができるために、残るデータ成分は、細胞ローリングしているような動きのある画像のみとなる。その後、この得られた画像の濃度変換、すなわち、輝度やコントラストを調整することにより、二値化においてより明確にローリング細胞の抽出を可能

にすることができた。

得られた画像を二値化させてソフトウェア上で輝度が高く、かつ細胞のサイズ程度の輝度ピクセルをもつ部分を自動認識させた。細胞ローリングの動画では、一方の画像のエッジから新たに細胞が現れて、一方のエッジへと細胞が流れていく様子になる。この部分の問題点については、本ソフトウェアに付属の自動識別機能により追跡することができた。

このような検討により、細胞ローリングの動画解析におけるアルゴリズムを実施することで、サンプルから得られた情報を一定のプロトコルにより処理でき、客観的なデータ解析を確立できた。

3. マイクロチップ内における加圧条件と粒子速度の分布解析

2) で構築したアルゴリズムを基本として、差分処理により背景画像を除去した。フレーム前後での差分処理における画像状態を図5に示す。差分処理により鮮明にローリングしている細胞成分のみを抽出することに成功した。図5 (B) の画像から、輝度の高いピクセル成分を二値化により自動認識させることで、細胞を識別してその速度分布をソフトウェア上で解析した。用いた粒子は $10\ \mu\text{m}$ と $20\ \mu\text{m}$ のサイズのラテックス粒子である。細胞の解析を想定しており、この程度の範囲内の粒子認識や速度の識別が重要であると考えられた。いずれのサイズの粒子においても、良好にローリ

ングしているものだけを抽出することができた。図6に示すように、個々の粒子の経過時間をX座標の変位という形でプロットすることでその傾きから速度を定義した。これにより、速度のばらつきを効率よく識別できる。図7には、 $10\ \mu\text{m}$ のラテックス粒子の移動速度分布、図8には $20\ \mu\text{m}$ のラテックス粒子の移動速度分布を、マイクロチップ内部での圧力に対してプロットした図を示す。図7ならびに図8を比較した結果、粒形に関わらず、マイクロチップ内部の印加圧力を変異させた場合には、それに応じて速度が変化することが示された。また、圧力に対する応答は粒形のサイズにほとんど依存していない。つまり、細胞のサイズのばらつきが 10 から $20\ \mu\text{m}$ 程度の範囲であったとしても、ローリング速度は一定の送液のずり応力に追従できることが示された。

また、圧力の連続的な変化に応じて直線的に粒子の速度も制御されていることから、マイクロチップ内部での細胞ローリングを誘起させるためのずり応力をより精密に制御しているものと考えられる。

D. 考察

初年度から平成24年度までは、マイクロチップを構築するための基礎技術としてコーティング剤やマイクロチップの形状（流路の形、配置等）について詳細に検討を続けてきた。これらの基礎的な知見に基づいて最終年度である25年度は、マイクロチップによる細胞診断デバイスのプロトタイプを構築することができた。25年度の検討により、このマイクロチップシステムによって、粒子の動きや細胞の動きの制御を、マイクロポンプで精密にコントロールできることが示され、当初目標としていたデバイス開発という点において一定の成果が得られたと考えている。さらに、粒子の形状とローリング速度についても検討した結果、細胞のサイズ範囲である $10\ \mu\text{m}$ から $20\ \mu\text{m}$ の範囲においてはサイズの影響は殆ど受けないという結果も得られ、本システムがローリング解析において有効であると考えている。さらに、マイクロ流路のサイズを幅 $300\ \mu\text{m}$ から $150\ \mu\text{m}$ 程度で設計することで、顕微鏡の焦点範囲を考慮しても、視野範囲内のすべての細胞を画像で取得し、アルゴリズムによって二値化して自動認識させることが可能であった。この成果も顕微鏡を備えた診断システムを設計する上では、非常に有効な情報であり、プロトタイプでの検討において得られた重要な点であると考えている。さらに、山岡研究班が実施した間葉系幹細胞の分析データの評価からも本チ

ップシステムの精度や、有効性が実証されているものと考えられ、今後この装置系を用いて、ずり応力とリガンド固定化密度、細胞ローリング速度を網羅的に評価出来るのではないかと考えている。このプロトタイプを基礎として、今後産学連携により装置を専門とする部門や業者との連携により、より精度の高い装置系の開発が可能になるものと期待している。

E. 結論

最終年度である平成25年度では、当初目的としていた細胞診断システムのプロトタイプの開発と構築にまで到達することができた。一方で、検体を用いた評価や、得られたデータと臨床における循環がん細胞の検出感度、予後診断への可能性については、検討が進められていないので、今後臨床検体を用いた網羅的な評価が重要になるものと考えている。

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) Mahara A., Chen H., Ishihara K., Yamaoka T., Phospholipid polymer-based antibody immobilization for cell-rolling surface in a system for stem cell purification. J Biomater Sci, under

revise process

2) Mahara A., Chen H., 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) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Circulating tumor cell detection system on cell rolling microchip, The 15th International conference on biomedical engineering (Singapore) (2013) 「海外学会、口頭発表」
- 2) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Cell-rolling microchip for the detection of circulating -tumor cells (PMSE session, Oral presentation), ACS fall meeting (Indianapolis, USA) (2013) 「海外学会、口頭発表」
- 3) Atsushi MAHARA, Hao CHEN, Carlos AGUDELO, Kazuhiko Ishihara and Tesuji YAMAOKA Cell-rolling microchip for diagnosis of peripheral circulating cells such as CTCs (PME session, Poster presentation), ACS fall meeting (Dallas, USA) (2014) 「海外学会、ポスター」

4) 馬原淳、陳 顥、カルロス ア
グデロ、石原 一彦、山岡 哲
二

(ア)細胞ローリングを利用した細
胞診断用マイクロチップの開
発 文部科学省・科学研究費
補助金・新学術領域研究「ソ
フトインターフェースの分子
科学」(東京大学・東京)「国
内講演、ポスター発表」

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし

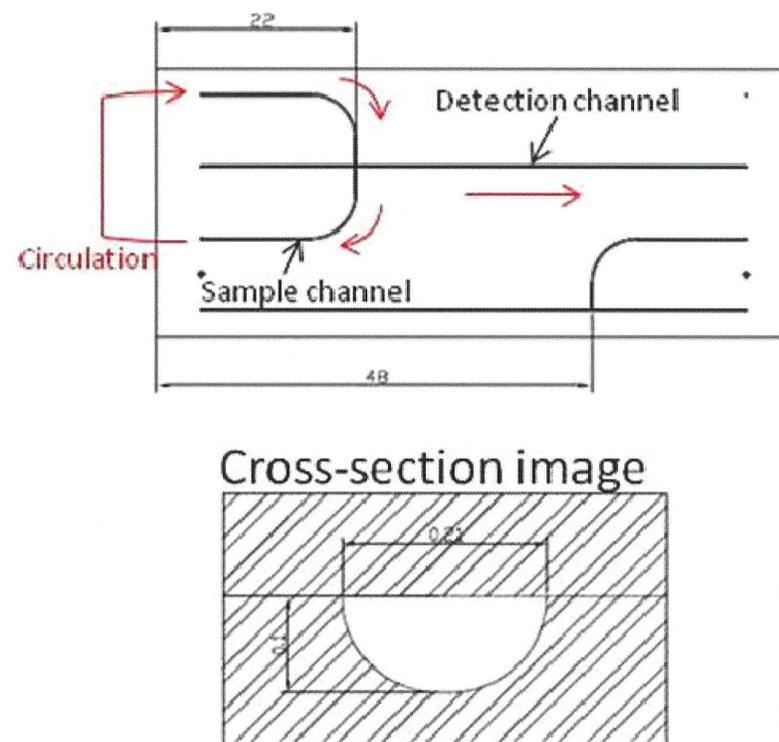


図1 交差型マイクロ流路の設計 (Sample Channel に検体となる細胞懸濁液を循環させ、Detection Channel には交差部分にある細胞懸濁液が一度に流れることで、細胞ローリングを一定の細胞数で誘起できる)

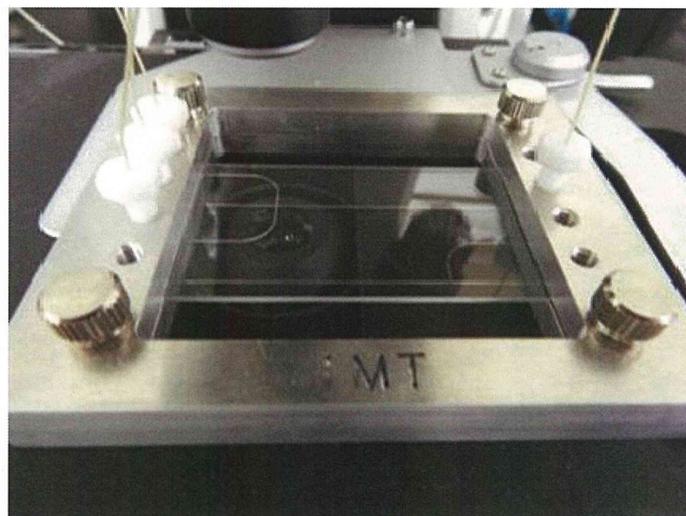


図2 交差型マイクロ流路の外観 (各チャンネルに PEEK 製のマイクロチューブを接続している)