



図3 循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプ

1. 4ch Pomp system
2. Max Sample volume (1ml)
3. Injectable cell suspension :  $\sim 10^7$  cells
4. Non-specific absorption of cells :  $\sim 1/10^8$  cells

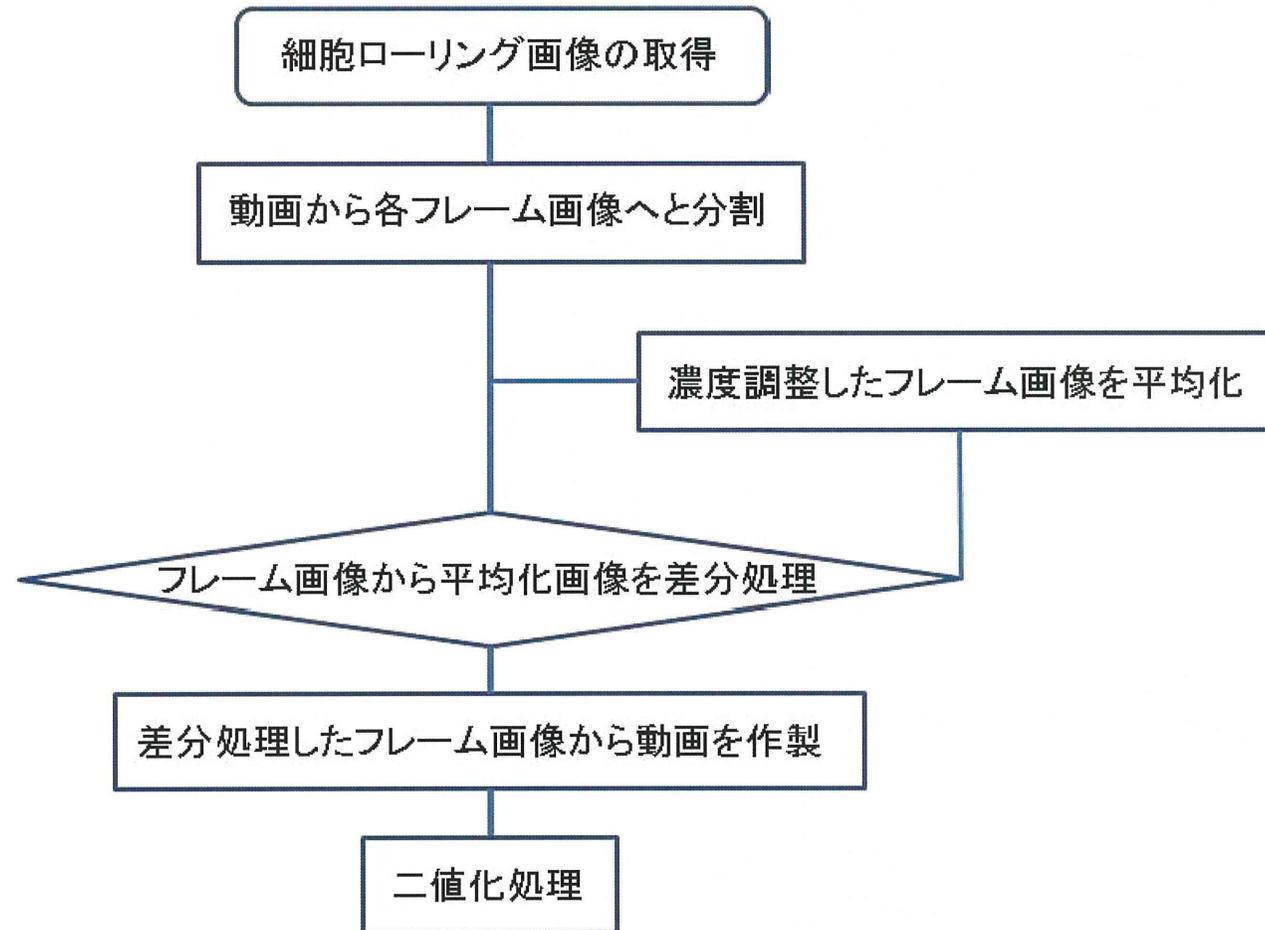


図4 細胞ローリングを解析するための動画のアルゴリズム

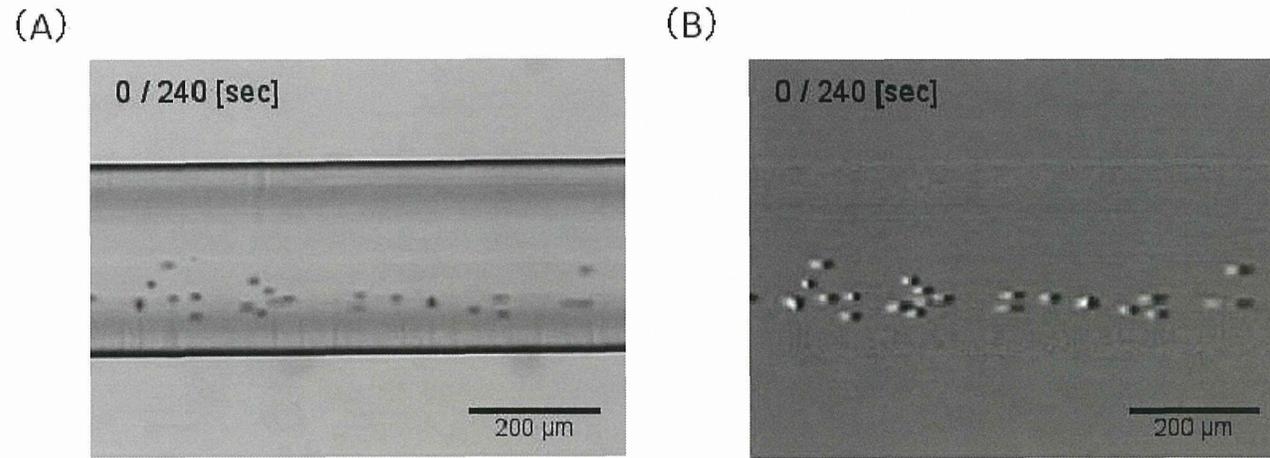


図5 フレーム毎の差分処理前 (A) と処理後 (B) におけるローリング細胞の抽出画像

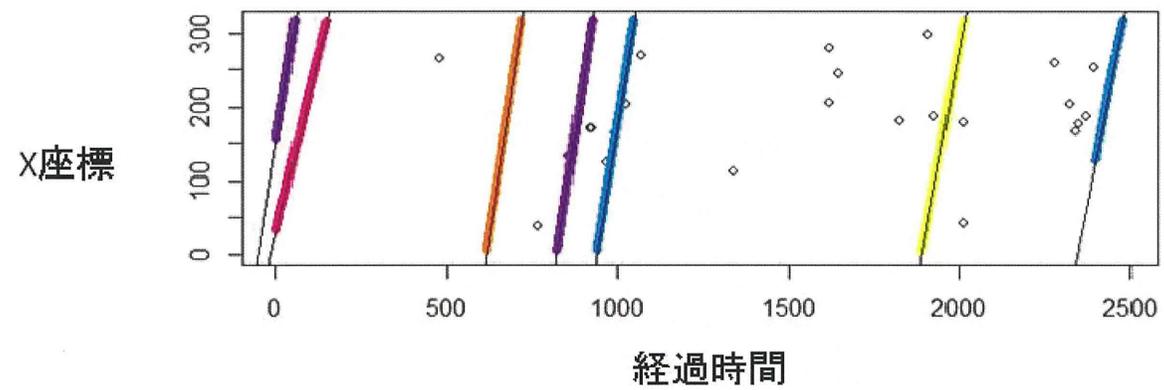


図6 画像の速度解析から得られた個々の細胞の経過時間と X 軸座標の変位

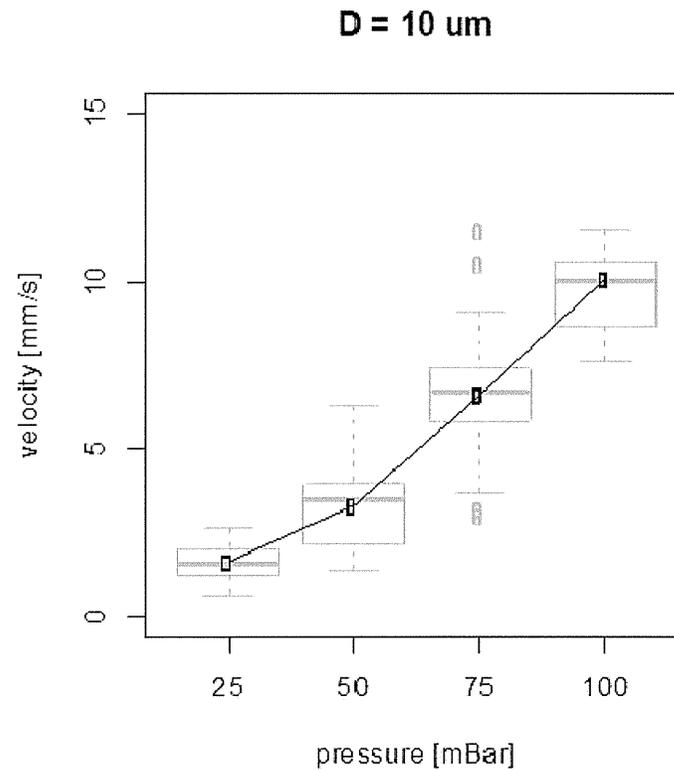


図7 10 $\mu\text{m}$  のラテックス粒子を用いたマイクロ流口内部の圧力と粒子の移動速度 Asterisks indicate significant difference between 10  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in diameter. p-values = 0.05 or lower were considered as statistically significant using the t-test. (\*\*\*) p < 0.005, n = 16-87)

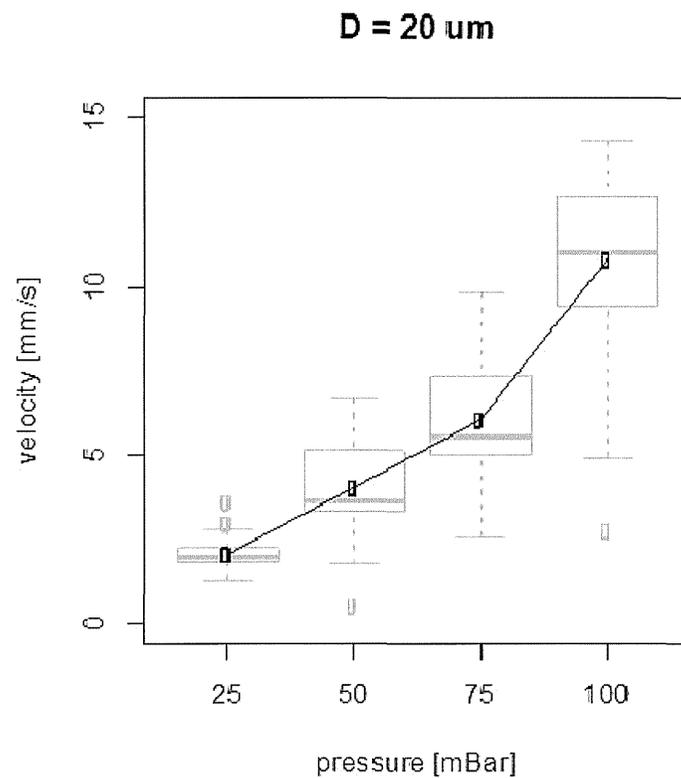


図8 20 $\mu\text{m}$  のラテックス粒子を用いたマイクロ流ロ内部の圧力と粒子の移動速度 Asterisks indicate significant difference between 10  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in diameter. p-values = 0.05 or lower were considered as statistically significant using the t-test. (\*\*\*) p < 0.005, n = 16-87)

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 細胞診断用マイクロチップデバイスの構築と同時に、このプロトタイプ装置の性能を評価するためには、細胞検体を使った細胞ローリングの速度分布の解析や、標準サンプルでの評価が必要になる。本年度では、ラットから採取した脂肪由来間葉系幹細胞を用いてリガンド固定化剤をコートした界面における細胞流速分布の解析と、米国で販売・実施されている CTC 検査装置の標準サンプルを用いてマイクロチップ内でのローリング観察を実施した。

A. 研究目的

血中において  $10^9$  個に数個程度しか存在しないと報告されている循環がん細胞は、がんの転移の原因となる細胞であり、細胞ローリングという回転運動を介して、付着した組織で増殖することで体内の様々な臓器へと転移することが出来る。本プロジェクトでは、この細胞ローリングという現象を指標として、リガンド固定化マイクロデバイスを用いた細胞診断用デバイスの開発を目指して研究を進めている。最終年度である 25 年度では、これまでの研究成果を集結して、マイクロチップならびに微量の液体の動きを制御できるマイクロポンプを配備した細胞診断デバイスのプロトタイプの構築を進めた。一方で、この研究分担グループでは、マイクロチップや開発したリガンド固定化剤の界面

において起こる細胞ローリング現象を解析して、当初の目的であるヒストグラムの描写とそれによる速度分布解析の可能性について検討した。微粒子などを用いた検討では、均一な径や比重をもつものを分析できるために、分析し易い。しかし、ターゲットとしている循環がん細胞は、存在している個数が非常に少ない上に、細胞以外の成分との共存や、サイズ、比重といった観点において非常にヘテロジニアスな集団になる。このような状況下においても開発した、システム、ソフトウェアで解析できるかを検討することは実用化を目指す上においても極めて重要である。本研究では、ヘテロジニアスな細胞集団として、ラットの脂肪由来間葉系幹細胞を用いて、マイクロチップ内での細胞ローリング挙

動の観察と、速度分布をプロットした。さらに、現在米国において米国食品医薬品局 (FDA) 認可の循環がん細胞診断装置が利用されており、その標準サンプルとして用いられる試料のローリング挙動についても検討した。

## B. 研究方法

分担研究者によって構築されたシステムを用いて、実際の細胞検体を使った場合のローリング速度解析ならびに CTC 検査標準サンプルの計測を実施した。下記に詳細について記述する。

### 1. 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

交差型マイクロチップの部分において、交差している箇所から一定量の検体を分析流路へとインジェクトできるか検討した。インジェクト後、それぞれの細胞における流速分布を画像上にプロットした。

次いで、培養した細胞検体を用いてローリング速度分布を評価するために、ラット脂肪間葉系幹細胞を用いた。ラット (SD ラット、7-8 週齢) の脂肪組織を採取して、ミンスした後に、ミンスした組織をトリプシン溶液に浸漬させて 37°C のインキュベータ内で静置した。その後、遠心分離によりミンスした組織を除去し上清を培養皿へ播種して細胞培養用のインキュベータ内で培養した。得られた細胞を脂肪由来間葉系幹細胞として実験で使用した。細胞懸濁液を調製して、マイクロ流路内へとインジェクトし、そ

の後流れている細胞の速度を開発したアルゴリズムに従って抽出した。得られた速度成分を、速度成分に対する細胞の個数の形でヒストグラムによりグラフ化し、細胞ローリングの速度分布について考察した。

### 2. CTC 標準試料を用いた細胞ローリングの観察

CTC 細胞の評価の可能性について検討するために、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採用した。標準サンプル内には、CTC 陽性細胞として知られている EpCAM 陽性の固定化された細胞があり、この細胞のローリング観察を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 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

交差型流路の部分における細胞のインジェクト直後の様子の画像、ならびに速度解析した後のベクトル表示について図 1 として示す。解析の結果、交差部分に有る細胞集団は、流路内の圧力をスイッチさせることで一定量の細胞を検出流路へと導入することができた。さらに、インジェクトした細胞のベクトル表示の解析から、比較的一定の速度集団をもつ細胞であることが示されており、流路内の位置によらず一定の速度によって打ち出されていた。

さらに、ラット脂肪組織由来の間葉系幹細胞をマイクロ流路内へインジ

ェクトして、その様子を観察しアルゴリズムにより速度解析を実施した。その結果、流路内の細胞を効率的に識別して、速度を算出することができた（図2）。得られた速度分布のヒストグラムを図3に示す。得られたヒストグラムから、2つの群の細胞ポピュレーションが示されていた。細胞のメジャーポピュレーションよりも高い分布をもつ、Floating cell のポピュレーションがあった。これは、界面に接触することなく流れている細胞であると判別することができた。またメジャーポピュレーションの中に、最もローリング速度分布が遅い「Low velocity cell」の分布が見られた。これは、基材に対して1/10程度も遅い速度でローリングしており、このような細胞集団の個数や、分布のシフトを定量的に出来る可能性が示唆された。

## 2. CTC 標準試料を用いた細胞ローリングの観察

CTC 検査用試薬の標準サンプルを開発した装置へとインジェクトしてその様子を観察した結果を図4に示す。固定化された細胞がマイクロチップ内部を流れている様子が観察された。標準サンプル内に十分な量、濃度の固定化細胞が含まれておらず、今後はこの検体を濃縮した実験系での評価が必要になってくるものと考えられる。

### D. 考察

新たに開発したマイクロチップと診断デバイスのプロトタイプを用いることで、流路の圧変化により一定量の細胞懸濁液を検査用流路へと効率的にインジェクトすることに成功した。また、細胞検体でも同様な結果であったことから、細胞を用いたローリング解析用デバイスとしての有効性が示されたものと考えている。さらに、ヘテロな細胞集団である脂肪由来の間葉系幹細胞のローリング速度分布を計測した結果、いくつかの集団として識別できていることが示された。マーカーの発現や、その程度が大きく異なることが考えられ、そのようなヘテロな違いを速度分布として識別しているものと考えられる。さらに、定量的な解析を進めることで、マーカーの発現密度や、検出感度（何%程度の陽性細胞や、マーカー発現密度が高い細胞を識別できるのか等）を評価できるものと考えている。このようなアルゴリズムを用いた評価系へと展開させることで、客観的な視点から表面マーカー密度を評価することができ、従来のような染色法による陽性・陰性細胞の識別よりも感度・定量性にすぐれているものと考えている。

さらに、FDA 認可の CTC 検査装置の標準サンプルを用いて実験を実施したが、細胞のローリングは観察されたものの、定量的な解析にまでは至らなかった。今後、この標準サンプルを基準としてデータを整理することで、既成品との検出感度の比較や、本装置の性能について客観的な評価ができる

ものと考えている。

## E. 結論

細胞検体を用いて、マイクロチップによる細胞診断デバイスの評価を実施した。本プロジェクトの実験計画であった、診断デバイスのプロトタイプ of 構築を終え、その装置を使って細胞検体における検出感度や細胞ローリングの識別を評価できた。評価系や装置等は本プロジェクトで確立したが、リガンド固定化量や、ずり応力を変化させた場合のローリング速度分布の変化など、今後検討する項目は多岐に渡るため、本プロジェクト終了後も継続して実験を実施していく予定である。

## 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、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

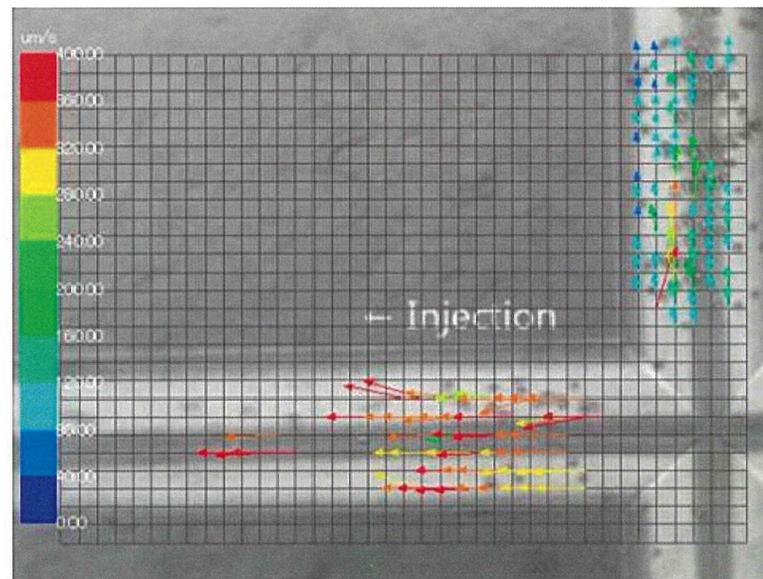


図1 交差流路付近における粒子の動き。流路の切り替えにより流路の交差している箇所にある細胞懸濁液を検査流路へとインジェクトすることが可能になった。(画像解析による速度分布解析画像)

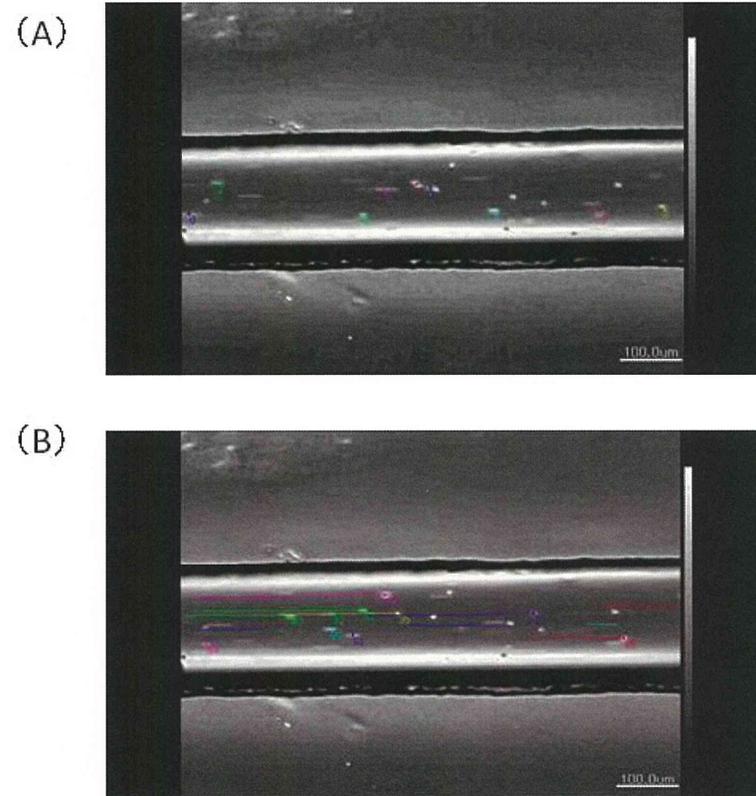


図2 (A) マイクロ流炉内における画像解析後の細胞認識部位の重ねあわせ画像。(B) 速度解析後の各細胞のベクトル表示

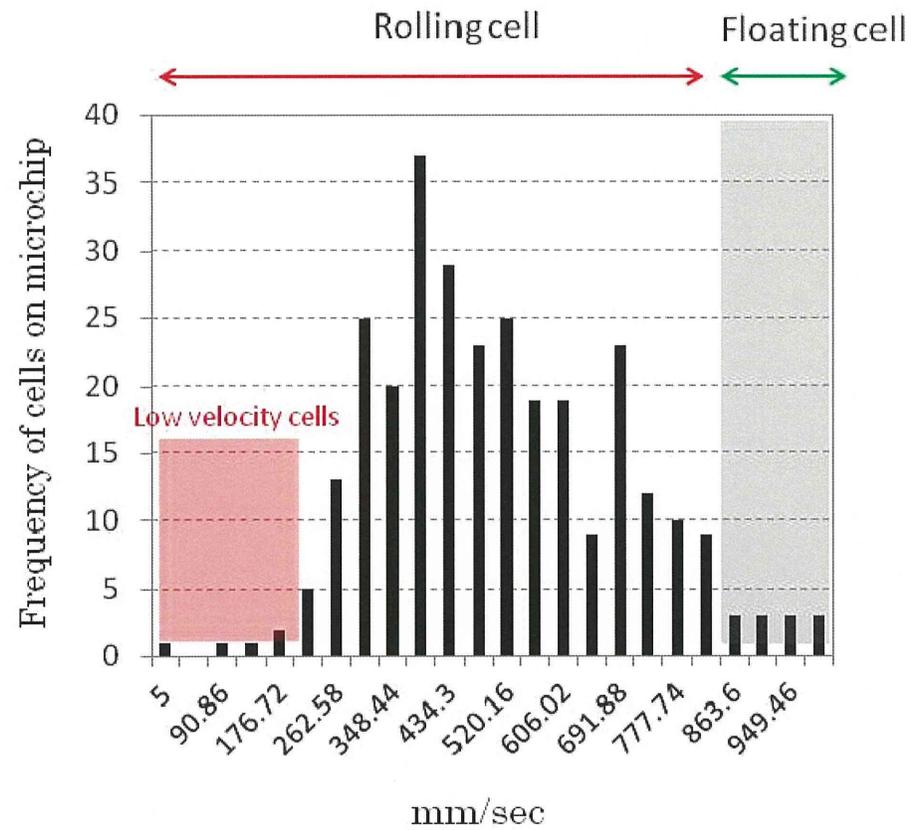


図3 脂肪由来間葉系幹細胞をマイクロチップ内で流した場合の流速分布

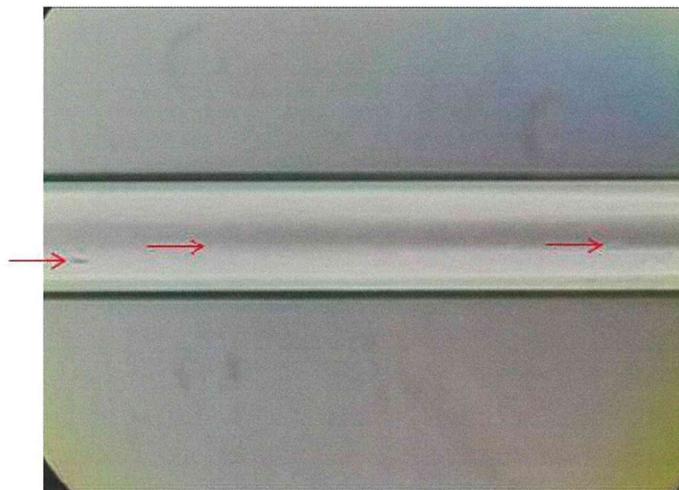


図4 CTC 検査標準サンプルをマイクロ流路内で分析した場合の様子

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
Mahara, A., Chen H., Ishihara K., Yamaoka T	Phospholipid polymer-based antibody immobilization for cell-rolling surface in a system for stem cell purification.	Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition	Under revise process		2014
Mahara, A., Chen H., 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
馬原 淳	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	2013年7月11日-12日
Atsushi MAHARA	Cell-rolling microchip for the detection of circulating -tumor cells	ACS fall meeting	Indianapolis, USA	2013年9月8日-12日
<u>Atsushi MAHARA</u>	Circulating tumor cell detection system on cell rolling microchip	The 15th International conference on biomedical engineering	Singapore	2013年12月4日-7日
Atsushi MAHARA	Cell-rolling microchip for diagnosis of peripheral circulating cells such as CTCs	ACS Spring meeting	Dallas, USA	2014年3月16日-20日

## Cell-rolling microchip for the detection of circulating-tumor cells

Atsushi Mahara<sup>1</sup>, Hao Chen<sup>1</sup>, Carlos Agudelo<sup>1</sup>, Kazuhiko Ishihara<sup>2</sup> and Tetsuji Yamaoka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, JAPAN, <sup>2</sup> Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan.

yamtet@ncvc.go.jp.

### INTRODUCTION

Circulating tumor cells (CTCs) are existing in the peripheral blood of cancer patient, and relation of CTCs to the metastatic spread of carcinomas has been generally recognized in not only basic research field but also the clinical stage<sup>1</sup>. However, a few CTCs are circulating in the blood flow. Recent study focused on the CTCs detection and characterization by using the microchip technology<sup>2-4</sup>. Antibody-immobilized chip and filter system which could capture the specific cells on the microdevice has been widely investigated for the detection of the rare CTCs. However, non-specific absorption of the other cells has not been suppressed in the detection of CTCs, and its sensitivity is greatly reduced. Here, we have developed the cell-rolling microchip for the specific detection of various cells. In our previous work, the cell-rolling column was developed for the separation of stem cells. This column separated the specific cells by the cell rolling velocity under the media flow. In this study, this mechanisms was applied for the cell detection on the microchip systems. The detection sensitivity would be increased by the evaluation of rolling-velocity because of the continuous interaction between the cell surface and immobilized ligand. To immobilize the antibody, copolymers of poly[2-methacryloyloxyethyl phospho-rylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate (*n*BMA)-*co*-*N*-vinylformamide (NVF)] (PMBV) were synthesized by random polymerization. Microflow pass (width: 300µm, depth: 100µm) were coated with the polymers, and anti-CD34 antibody were covalently attached by the crosslinker. Cell-rolling velocity of cultured cells on the microchip system was evaluated.

### EXPERIMENTAL

**Polymer synthesis and preparation of microchip** Amphiphilic phospholipid polymer (PMBV) with MPC, *n*BMA and NVF was synthesized by radical polymerization of corresponding monomers using  $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutyronitrile (AIBN) as an initiator. The monomers and initiator were dissolved in ethanol, and the mixture was stirred at 60°C for 6h. After the reaction, the polymers were precipitated twice by hexane and diethyl ether. Composition and molecular weight of the two polymers were determined by <sup>1</sup>H-NMR (Geminn 2000/300; Varian Inc., CA, USA), and GPC (Shodex SB804-HQ; Showa Denko K.K., Tokyo, JAPAN) in mixed solvent (EtOH:Pure water =0.7:0.3, included 10mM LiBr), respectively. The MPC/*n*BMA/NVF composition of PMBV40 and PMBV30 were 0.1/0.5/0.1, and 0.3/0.6/0.1, respectively. To produce the amino group in the polymer, the polymers were hydrolyzed with 60mL of 2N HCl. After the neutralization, the polymers were purified with the dialysis tube (Figure 1).

Microchip for the detection of cell-rolling velocity was manufactured by Institute of Microchemical Technology Co., Ltd., (Kanagawa, JAPAN). The microchip channel pattern was specifically designed for the evaluation of cell-rolling velocity (Figure 2). Microchip channel was coated with the copolymers, and the amino groups of the polymers were activated with the NHS-PEG-Maleimide crosslinker (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA). Reduced antiCD34 antibody was added into the channel and then the antibody was covalently conjugated on the channel through the activated copolymers.

**Evaluation of cell-rolling velocity on the microchip** The microchip was connected to the Microfluidics Flow Control System (MFCS; Fluigent, Paris, FRANCE) to strictly control the media flow in

the channel. The KG-1a and HL-60 cells were used as the model cells that cells were CD34 positive and negative cells, respectively. Cell suspension was circulated in the sample channel, and the cells were injected into the detection channel by the change of media flow direction. Rolling velocity were monitored on the CCD camera, and the velocity were analyzed on the personal computer.

### RESULTS and DISCUSSION

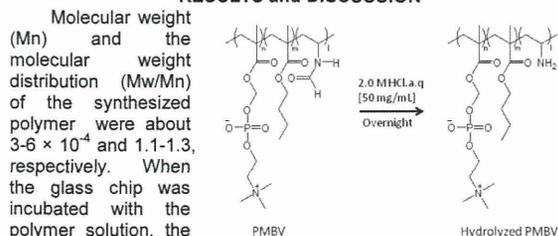


Figure 1 Structure of PMBV and hydrolyzation.

antibody could be traced by the radio-isotope experiments. The glass-made microchip channel was coated by this protocol, and the cell-rolling velocity was evaluated.

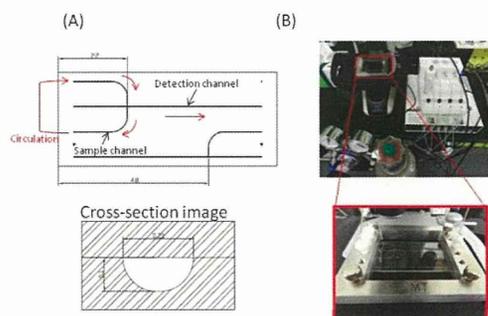


Figure 2 (A) Design of microchip for CTCs detection and (B) the chip and media-flow control system.

antibody could be traced by the radio-isotope experiments. The glass-made microchip channel was coated by this protocol, and the cell-rolling velocity was evaluated.

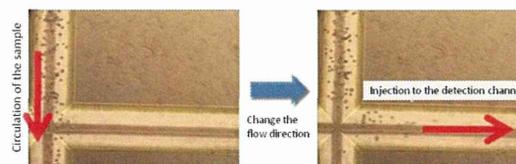


Figure 3 Detection system of cell-rolling velocity on the CTCs microchip channel.

KG-1a and HL-60 cells were used as CD34 positive and negative cells for the model system of CTCs detection, respectively. After the injection of the cell suspension, and the cells were stably circulated by the media flow without any non-specific absorption on the surface (Figure 3). When we used the optimized condition at 0.4 µl/min of media flow, the rolling velocity of KG-1a (CD34 positive) cells on the chip system was detected as about 40 µm/sec. On the other hands, the velocity of the negative cells were about 55 µm/sec. We observed

the significant difference between these rolling velocities. When the media flow was increased, the significant difference of the rolling-velocity was not indicated, and the cell-moving speed was almost same. Therefore, the significant difference was derived from the specific interaction of the surface maker and immobilized ligand.

#### **CONCLUSION**

Here, we successfully discriminate the cell type on the microchip by the cell-rolling velocity without any non-specific absorption. This chip system would apply for the CTCs detection system based on the cell-rolling mechanisms.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Foundation for Promotion of Cancer Research (23120501) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

#### **REFERENCES**

1. Lianidou, E.S.; Markou, A. *Clinical Chemistry* **2011**, *57*, 1242-1255.
2. Fehm, T.; Solomayer E.F.; Meng, S.; Tucker, T.; Lane, N.; Wang, J.; et al. *Cytotherapy*, **2005**, *7*, 171-185.
3. Zheng, S.; Lin, H.K.; Lu, B.; Williams, A.J.; Balic M.; Groshen, S.; Scher, H.I.; et al. *Biomed Microdevices*, **2011**, *13*, 203-213.
4. Nagrath, S.; Sequist, L.V.; Maheswaran, S.; Bell, D.W.; Irimia, D.; Ulkus, L.; et al. *Nature* **2007**, *450*, 1235-1239.

