

2013/3059B

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23年度 ～ 平成25年度 総合研究報告書

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23年度 ～ 平成25年度 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 72
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 76

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）
総合研究報告書

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 循環がん細胞とは、血中に循環しているがん細胞であり血中から漏出したこの細胞は、他の組織に定着して転移巣を形成する。本研究課題では、この循環がん細胞を高感度で検出するための新たなデバイス、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を目的とした。循環がん細胞は、他の臓器へ転移する場合に、血中で細胞ローリング現象と呼ばれる回転運動を介して組織へ生着し、転移する。このがんの転移メカニズムである細胞ローリングを検出原理とする循環がん細胞診断デバイスを創出することで、がん転移に係わるイベントの早期検出・診断を目指すものである。

分担研究者：山岡 哲二
生体医工学部・部長
国立循環器病研究センター研究所

A. 研究目的

循環がん細胞とは、血中を循環しているがん細胞であり、血中では細胞増殖能を持たないが、ひとたび他の組織に定着すると再び増殖能を示し、転移巣を形成する。このような循環がん細胞の存在については非常に古くから提唱されており、1869年 Ashworth TR によって、“A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death, Med J Australia 1869, 14: 146-7”で報告された。その報告から20年度には Lancet 誌において Steve Paget らが、“the seed and

soil hypothesis”を提唱し、さらに Fidler らにより詳細な検証が繰り返され、2003年には Cancer metastasis に関する論文（The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revised”が、Nat Rev Cancer に報告され、現在の循環がん細胞の理解に至っている。

血中で循環しているこの循環がん細胞 (Circulating Tumor Cells; CTCs) は、がん転移という重大なイベントに関わっており、がん患者の生存率のみならず、治療方針についても大きな影響を及ぼすことは周知の事実である。しかしながら、この細胞の存在を血中から診断という目的で簡便に検出す

ることは極めて難しく、その原因は、血中に存在する循環がん細胞の”存在率の低さ”であることが指摘されている。一般的に循環がん細胞は、血中にある細胞の 10^9 個中の数個程度であると報告されており、存在濃度が極めて低い。しかし、診断という目的に特化した循環がん細胞の高感度な検出法は確立されておらず、従来法を組み合わせた形での診断装置が現在臨床で利用されている。米国においては既に、アメリカ医薬品食品衛生局 (US Food and Drug Administration; FDA) において認可された装置 Cell Search システム (Varidex 社、米国) が臨床において利用されている。しかしながら、その検出感度や精度、さらには微量の検体から効率的にその診断を可能にすることを目的として、現在でも研究分野において様々な手法や、プロトコルの構築が進められている。現在までに、CTC を特徴付けするための表面マーカーとして、EpCAM や CD146、さらには CD176 や anticytokeratin (CK) が報告されており、特徴的な遺伝子発現パターンも認められている (図1)。このようなデータを基にして、現在までに様々な種類の循環がん細胞の回収法や、検出法が報告されており、2007年の Brecht PP らのグループにより系統的にまとめられたものが報告された (表1, 2)。基本的な戦略としては、表面マーカーに対する抗体を用いて、磁気ビーズに固定化した抗体によりターゲット細胞を回収する

手法 (Magnetic activated cell sorting: MACS) が採用されており、Cell search システムにおいても、EpCAM 抗体を用いて標的細胞を回収することで、循環がん細胞の候補となる細胞集団を識別している。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効であることを報告した。これは、表面マーカーを指標とした細胞の診断から、がん転移に係わるイベントを予見できるという画期的な報告である。しかしながら、フローサイトメトリーによる診断では、多くの細胞検体が必要であり、また染色条件やゲーティングの設定など、ターゲット細胞の存在率が低いものである場合には、十分な検出が望めない場合がある。このために、少量の検体で、効率的にターゲット細胞を検出するマイクロチップ技術の創成が進められている。2007年、Nagrath らは、マイクロチップを利用した新たな CTC 検出デバイスとして、マイクロチップ内に、EpCAM 抗体を固定化し、流路内に配列したピラー表面で細胞をキャプチャーすることによりその個数から循環がん細胞を診断できるデバイスを報告した (Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S. et al Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by

microchip technology, Nature 450, 1235 (2007))。このデバイスは、マイクロチップと、採取した血液検体を流すための圧力センサーから構築されている (図 2)。この報告の中で Nagrath らは、臨床からがん患者の血液検体を利用して、装置により検出された CTC 細胞と、がん患者とのがん転移やステージに関する相関を調べており、予後を診断する上で従来装置などと比較しても極めてよい精度を有していることが報告されている。このようなマイクロデバイスを活用することで、一定の検体量で効率的に循環がん細胞を診断できることが期待されている。循環がん細胞を検出するための新しいマイクロチップデバイスとして、抗体を固定化したマイクロ流路のみならず、循環がん細胞と他の血液細胞との形態的な違いに着目して識別するためのマイクロチップ技術なども報告されており、その手法は様々である (図 3)。

本研究プロジェクトでは、循環がん細胞を検出する新たなデバイスを開発することを目指し、我々がこれまでに開発してきた細胞ローリング機構に基づきリガンド固定化マイクロデバイスを構築することを目指した。細胞ローリングとは細胞表面の分子と、固相界面に固定化されたリガンド (あるいは生体内においては血管内皮細胞が提示する表面マーカに対するリガンド) とが一時的に、連続的な相互作用をすることで、細胞が界面上を回転運動する現象である (図 4)。

このような細胞ローリング現象は、生体内でも常に起こっている現象であり、炎症部位に白血球が動員されるときに起こる白血球ホーミングの機構においても細胞ローリング現象が認められている。つまり、生体内において、ターゲットとする細胞を選択的に部位特異的に輸送するための手段としてこの細胞ローリング現象が起こり、細胞表面マーカに対して選択的であり、さらにリガンド密度によって回転速度を精密に制御できていることが知られている。これまでに我々は、このような細胞ローリング現象を *in vitro* で模倣して、特定の表面マーカ密度をもつ細胞集団を識別し分離するための間葉系幹細胞分離デバイスを作製し報告してきた (A Mahara and T Yamaoka Biomaterials, 31, 4231-4237 (2010), A Mahara and T Yamaoka Biotechnology Progress, 26, 441-447 (2010))。この細胞分離メカニズムとしての細胞ローリング法は、すでに特許出願済みである。このような細胞の表面マーカに対する特異的な現象を、循環がん細胞診断デバイスへと応用することが本研究プロジェクトの目的である。循環がん細胞が血管内で循環して、他の組織へと生着し転移する場合、この細胞は細胞ローリングにより循環している速度を減少させ、その後リガンド密度と血流のずれ応力とのバランスに応じて回転が停止し、生着するというメカニズムであることが知られている (Cancer Letter 253, 180-204 (2007))。つま

り、循環がん細胞の転移の有無については、細胞ローリングが関わっており、その速度が遅い細胞であれば、他臓器へと生着する可能性も極めて高いということになる。従来までのフローサイトメトリや MACS 法などの観点では、表面マーカーの有無において細胞を識別しているが、循環がん細胞の転移という観点では、表面マーカーの有無のみならず、そのマーカーの密度がローリング速度とどのように関わっているかが重要であると考えられる。このような新たな視点に基づいて、本プロジェクトでは、リガンド固定化マイクロチップによる循環がん細胞診断デバイスを設計し、がんの転移に係わる細胞ローリングという視点から高感度な検出と診断技術の確立を目指した(図5)。

本実験プロジェクトでは、循環がん細胞を検出するための「高感度に標的細胞を検出する」ための材料設計から、「個々の細胞ローリングを検出し、その速度分布を識別するための診断デバイスの構築」という装置系の開発まで、実現化するためには多岐にわたる視点と検討が必要である。そこで、平成23年度では、主に非特異吸着を完全に抑制できるためのリガンド固定化界面の設計や、コーティング剤の開発という点に重点を置いて研究を進めた。リガンド固定化界面における細胞の非特異的な反応は、検出感度の性能において顕著に影響するためであり、精密な設計とその実証が極めて需要であった。さらに、平成24年度で

は、開発したリガンド固定化剤の物性評価、細胞ローリングにおける特異性の性能評価を中心として、研究を実施した。同時平行して、マイクロチップ構造についての検討も開始し、細胞ローリングを効率的に誘起できる流路系を考案し、計画を少し前倒しして検討を進めた。最終年度である25年度は、開発したリガンド固定化剤、マイクロチップ、さらには微量の総液量をコントロールできるマイクロ流路デバイスを統合して、細胞診断デバイスのプロトタイプの実験を実施した。また、得られたデータから、細胞ローリング速度の速度分布をコンピュータ上で解析するためのアルゴリズムの検証も実施して、材料設計のみならず、ハードウェアの構築から、ソフトウェアの検証まで、診断デバイスで求められるシステム全体のブラッシュアップを図った。このような経過を経て、最終年度では、リガンド固定化マイクロデバイスを配置した細胞ローリング機構を検出原理とする細胞診断デバイスを創生することに成功した。これらの実験の方法、結果の詳細について下記に記述する。

B. 研究方法

1. 非特異吸着を抑制する新規リガンド固定化剤の開発

1.1 スルホプロピルベタインの合成

ガラス界面においてリガンドを固定化する必要があることから、界面からベタインポリマーを重合する手法について検討した。ガラス界面に対してシランカップリング剤により開始剤である Br を導入し、その後、スルホプロピルベタインモノマーを臭化銅 (I)、ビピリジン存在下で、脱酸素条件により 37°C の条件下で原子移動ラジカル重合反応 (ATRP) により反応させた。その後、リガンドとなる抗体を導入するために、活性化エステルを有するビニルモノマーを同様に ATRP により反応させた。界面に対するグラフト重合の評価法として、X 線光電子分光法 (XPS) ならびに水接触角測定により評価した。また、コントロールとして、界面に対してポリアクリル酸のグラフト鎖を導入したのも作製し、比較検討した。

1.2 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) を基礎骨格にもつポリマーの合成

2-Methacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC) ポリマーは、タンパクの吸着や細胞の非特異吸着を抑制する分子として開発され、多くの研究で利用されている。そこ

で、ベタイン系ポリマーの候補分子として、脂質イオン基をもつ MPC と疎水鎖を持つメタクリル酸 *n*-ブチル(*n*BMA)、そして *N*-ビニルホルムアミド(NVFA)のランダム共重合体を開始剤アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) によりラジカル重合したポリマーを合成して実験で用いた。精製過程では、再沈殿によりモノマーを除去した後に、2 N の塩酸溶液を添加することで NVFA の側鎖を加水分解して、アミノ基を導入した。合成したポリマーはサイズ排除クロマトグラフィー (GPC)、NMR により評価した。合成したポリマーを MPC-BMA-NVA としてガラス界面に対するリガンド固定化材料として実験で用いた。

2. リガンド固定化界面の物性評価

2.1 MPC を基礎骨格とした新規合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

加水分解によりアミノ基を導入した MPC-BMA-NVA ポリマーをエタノールに 5mg/ml の濃度で調整し、24 時間 UV オゾンにより洗浄したガラスを浸漬させた。30 分室温により十分に乾燥させた後に、再びポリマー溶液に浸漬して表面コーティングを行った。その後、洗浄することにより MPC-BMA-NVA によりコーティングしたガラス界面を調製した。表面に対するポリマーの修飾効果を X 線光電子分光法 (XPS) で評価した。さらに、修飾したガラス基

板をイオン交換水で一晩浸漬して、その後 60°C で 30 分乾燥させて 2 θ 法により水接触角を測定した。

2. 2 ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

ガラス界面に対するタンパクの非特異吸着能の検討並びに固定化抗体量を評価するために、ラジオアイソトープを用いて評価した。抗ラット CD90 抗体を 2-メルカプトエチルアミン溶液により 37°C で 1 時間インキュベートして F(ab)'₂ のフラグメントを作製した。サンプルは、Sephadex G25 カラムをもちいて精製し、抗体量は BCA 法により定量した。この抗体を、クロラミン T 法により I¹²⁵ で標識した。この場合も同様に、Sephadex G25 カラムにより抗体を精製した。調製した I¹²⁵ 標識 F(ab)'₂ 抗体をガラス界面へ添加し、37°C でインキュベート後、リン酸緩衝液により洗浄して、界面に吸着している、あるいは固定化されている抗体量を γ カウンターにより定量した。

3. リガンド固定化界面での細胞ローリング挙動

3. 1 スルホプロピルベタインを固定化したガラスキャピラリーによる細胞ローリング挙動の観察

スルホプロピルベタインポリマ

一ならびにポリアクリル酸修飾ガラスキャピラリー (内径 0.5mm, 長さ 10cm) を用いて、顕微鏡下で高速度カメラにより細胞の流れる様子をモニターした。細胞はラットの脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。ラットの脂肪組織を酵素により処理してメンブレンによりろ過した後に、懸濁液を培養皿へ播種した。接着した細胞を継代し、継代数 3 回までのものを実験で用いた。高速度カメラにより記録されたデータから、ガラス界面に接着している細胞ならびにローリング細胞を評価した。

3. 2 マイクロ流路に対する MPC ポリマーを固定化した界面と細胞ローリング挙動の解析

汎用のフローチャンバーに対して、MPC-BMA-NVA ポリマーを添加し、室温でインキュベートすることでフローチャンバーに対してポリマーを修飾した。その後、抗 CD90 抗体を反応させて実験に用いた。細胞は、ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。フローチャンバー内に細胞懸濁液 (2×10⁴ cells/ml) を注入し、ローリングしている様子を観察した

3. 3 汎用型マイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量化

汎用のマイクロ流路チップ (Model ib80501; ibidi GmbH, Martinsried, Germany) の流路に対

して、0.1mg/mL の濃度で調整したポリマー溶液を加えて 5 分インキュベートして、流路界面にポリマーをコートした。洗浄後さらに、同様の手法でポリマー溶液を添加してポリマーをコートした。次いで、還元処理された antiCD90 抗体をポリマーでコートした流路内へと導入し、室温で 1 時間インキュベートした。その後未反応の抗体をリン酸緩衝液により洗浄して、抗体固定化流路を作製した。MPC:nBMA:NVF の組成比が 30:60:10 (MPC 含有量 = 22.8%) ならびに、40:50:10 (MPC 含有量 = 36%) を作製し、リガンドとなる抗体を固定化するためのポリエチレングリコールリンカーを側鎖のアミノ基に対して 1、0.5、0mol 当量、となるように加えることで、6 種の界面コーティング条件を用いた。

細胞ローリングの実験において用いる細胞として、ラットの脂肪組織由来の間葉系幹細胞を用いた。ラット (SD rat, 7week) の腹部脂肪組織を採取し、コラゲナーゼによって処理し濾過後、接着細胞培養皿へ播種して培養した (培養液: α -MEM, 10%FBS)。その後、接着した細胞分画のみを培養した。表面マーカーの発現はフローサイトメトリー (FACScaliber, BD) により検討した。作製した流路に対して、脂肪由来間葉系幹細胞 (継代数 3-7 代) をディスポーザブルシリンジによりインジェクト (3.0×10^3 cells/ μ

L) し、シリンジポンプからリン酸緩衝液を流速 $30 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度でチャンバーへ流し、その時のローリング細胞数を高速度カメラ (EM-CCD デジタルカメラ; Hamamatsu フォトニクス; Shizuoka, JAPAN) により定量した。

4. マイクロチップの構造・流路サイズの検討

4.1 スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製

z 軸方向への加工精度をもつフェムト秒レーザーを装備した加工装置によりスライドガラスに対して任意のサイズ、形状の流路作成条件について検討した。

4.2 マイクロ流路構造の設計と作製

細胞ローリングをマイクロチップで安定に誘導するためには、一定量の検体となる細胞懸濁液を検査用流路へ流す必要がある。この条件を達成するために、幅 $300 \mu\text{m}$ 、深さ $150 \mu\text{m}$ のサイズをもつ流路を交差させた構造をもつチップを設計した。検体を一定の速度で循環させておく流路に対して、直交する形で検査用の流路を配置する。これにより、液の流れ方向をスイッチすることにより、流路が交差している箇所での細胞懸濁液が検査用の流路へとインジェクトされる。また、検査用の流路長として 23cm の長さをもた

せた。これは細胞懸濁液がインジェクトされてから、ローリングするための必要距離として設定してある。また、流路サイズが極めて小さいため、液の流速を一定にコントロールすることは極めて重要である。そこで、加圧式のポンプシステム（FLOWWELL and MFCS システム（FLUIGENT, Paris, France））を用いて流速をコントロールした。

4.3 ガラス界面に対する MPC-BMA-NVF ポリマーの界面固定化の検討

交差型流路をもつガラス製マイクロチップ界面に対するリガンド固定化剤として、MPC:nBMA の組成を 30:60 としたポリマーを用いた。NVF の組成を 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0 mol 当量となるように種々のポリマーを作製した。ポリマーの合成に関しては、NMR および GPC により評価した。ガラス界面に対するポリマーの修飾効果の検討として、水接触角測定、X 線光電子分光法により検討した。

4.4 ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路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。

4.5 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。

5. 循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築とその評価

5.1 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

設計した幅 300 μm 、深さ 150 μm 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属の枠で固定し、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

めの微量送液システムとして、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、一定量の細胞の細胞ローリングを観察する。その部分を CCD カメラで撮像して、動画解析に用いた。

5.2 ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの検討

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を再び動画へと再構築して、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、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、ソフトウェアでその細胞を自動識別して各フレームから移動する速度を算出した。

5.3 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

5.1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の細胞ローリングの制御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。

5.4 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

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部分の溶液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化し、細胞ローリングの速度分布について考察した。

5. 5 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。標準サンプルとは、CTC 陽性細胞として知られている EpCAM 陽性の固定化されている細胞であり、この細胞のローリング観察を実施した。

C. 研究結果

各項目における結果の概要を記述する。

1. 非特異吸着を抑制する新規リガンド固定化剤の開発

1.1 スルホプロピルベタインの合成

原始移動ラジカル重合法 (Atom Transfer Radical Polymerization; ATRP) によりガラス界面へ図6のような反応スキームに従ってスルホプロピルベタインを導入した。ガラス界面に対する X 線光電子分光法 (XPS) により界面の原子組成を評価した。その結果、C1s ピークの増加ならびに N ピークが検出できた (図7)。さらに、接触角測定では、ポリマーによる修飾により有意に接触角の減少が示された (図8 (A))。これらの結果より、本プロトコルを用いることで、ガラス界面にスルホプロピルベタインのグラフト鎖を導入できることが確認できた。界面に対する抗体の非特異吸着能と固定化量をラジオアイソトープにより検討した (図8 (B))。その結果、スルホプロピルベタインポリマーのグラフト鎖を導入することで、抗体の非特異吸着量が有意に減少していることが示された。さらに、活性化エステルを導入すると、抗体固定化量は $3\text{mg}/\text{m}^2$ となり界面全体に抗体を固定化できたことが示された。

1.2 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) を基礎骨格にもつポリマーの合成

合成の反応スキームを図9に示す。また、サイズ排除クロマトグラフィー (GPC) による分子量の測定結果を表3に示す。GPCによる分子量測定の結果より、平均分子量として 28kDa 程度のポリマーを合成することができた。また、分子量分布も極めて狭いことから、今回確立した合成プロトコルを用いることで安定に目的分子量をもつポリマーを合成することができた。溶解性試験の結果、このポリマーは、エタノールやリン酸緩衝液に安定に溶解した。モノマーの組成比を制御することで目的とする共重合体の作製を進めることができた。

2. リガンド固定化界面の物性評価

2.1 MPC を基礎骨格とした新輝合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

ポリマー修飾後のガラス界面における XPS 解析の結果を図10に示す。NVA が 0.1 から 10% 含むポリマーいずれの場合でも、C1s に由来するシグナルが観察された。さらに、N1s のピークもガラス界面への修飾によりわずかに増加していた。一方 C1s や N1s のピークの検出とは対照的に、Si2s のピークは、ポリマーの修飾により検出されなかった (表4)。これらの結果より、ガラ

ス界面に対してポリマーが修飾されていることが示された。

次に、水接触角測定の結果より、MPC-BMA-NVAによる修飾前と比較して、接触角の有意な増加が示された(図10)。また、ポリマーで修飾後さらに水中で十分に浸漬させた結果、NVAの組成比が1%以下の場合にのみ接触角の減少が示された。これは、NVAの組成比が高い場合には、界面におけるポリマーの構造転移がなく吸着しているものと考えている。また、NVAの組成比が低い場合、MPCやアミノ基が水界面側へ緩やかな構造転移を示すために、接触角が経時的に減少したものと考えている。さらに、この修飾ガラスを1NのNaOH水溶液に浸漬して1時間後における接触角を測定した結果、いずれのMPC-BMA-NVAポリマーで修飾した場合でも非修飾ガラス界面と同程度の水接触角まで減少した。これは、界面に吸着しているポリマーが分解され洗浄されたものであると考えられることから、ガラス界面にMPC-BMA-NVA共重合体溶液を浸漬することで、界面へポリマーを修飾できることが示された。

2.2 ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

抗体のSS結合切断反応ならびに I^{125} ラベル化反応後の精製において、Sephadex G25カラムを用いること

で目的物を精製できた(図11(A))。次いで、 I^{125} 標識F(ab)₂抗体をガラス界面へ滴下した結果、非修飾のガラス界面では、7mg/m²の抗体が界面へ吸着していた(図11(B))。これは界面に対して多層で抗体が吸着しているものと考えられる。しかし、MPC-BMA-NVA共重合体により修飾した界面の場合では、抗体の吸着量は10%以下に減少した。さらに、MPC-BMA-NVA共重合体の側鎖を活性化エステルにより活性化している場合には、0.84mg/m²の抗体が検出された。これらの結果より、MPC-BMA-NVA共重合体の修飾によりガラス界面へのタンパクの非特異吸着を抑制できることが示された。さらに、活性化エステルによりガラス界面へMPC-BMA-NVA共重合体を介して抗体を固定化できることが示された。ファンデルワールス半径を考慮すると、表面の10%程度が抗体で占有されている密度となる。

3. リガンド固定化界面での細胞ローリング挙動

3.1 スルホプロピルベタインを固定化したガラスキャピラリーによる細胞ローリング挙動の観察

脂肪組織由来間葉系幹細胞をガラスキャピラリーへ流した結果、ポリアクリル酸のグラフト表面においては細胞が界面へ吸着している様子が認められた(図12(A))。一方、スルホプロピルベタインによ

り修飾されたガラスキャピラリーでは、細胞はほとんど界面へ吸着することなく流れる様子が示された。細胞がガラスキャピラリーから溶出した時の溶出量とフラクションをプロットし、それぞれのフラクションにおける細胞ローリング速度を定量化した結果（図12（B））、ローリング速度は溶出時間が遅延するに従って 1.14mm/sec から 0.1mm/sec まで減少した。すなわち、ローリング速度が 0.1mm/sec 程度異なる細胞を分離できる可能性が示唆された。

3.2 マイクロ流路に対する MPC ポリマーを固定化した界面と細胞ローリング挙動の解析

MPC-BMA-NVA 共重合体によりマイクロチャンバー内部が修飾された界面を観察した結果、細胞は界面に吸着することなく流れた。（図13）。一方、抗体を固定化した界面では流れる速度は大きく減少しローリングしている細胞が多く観察された。すなわち、MPC-BMA-NVA 共重合体により抗体を固定化することにより、その界面で非特異吸着を抑制しながら細胞ローリングを誘起できることが示された。

3.3 汎用型マイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量化

市販のマイクロチップを用いて（図14）、流路内に表5に従って界面を構築した。この界面をもつマ

イクロチップを用いて、図14のようなシステムにより、細胞懸濁液を連続的に流した時に流路内にある「ローリング細胞」、「フローティング細胞」、「界面に吸着した細胞」を高速度カメラによって識別して定量化した（図15）。表6には、定量化した細胞の速度について示している。その結果、リガンドの固定化の有無によりローリング細胞数が有意に増加していることが確認できた。さらに、ポリマーコーティングされていない界面では、ローリング細胞は見られず、フローティングしているか、あるいは非特異的に界面へ接着している細胞が認められた。しかし、市販の流路サイズでは細胞サイズと比較して流路幅が極めて大きく、フローティング細胞数が半分程度であったことも問題点として見出された。

このような検討から MPC による非特異吸着抑制効果や、リガンドの固定効果による細胞ローリングを確認できた。また、流路サイズに関してはもう少し幅や深さを小さくしたサイズを用いることで、細胞ローリングの割合を向上させる可能性がある。このような細胞ローリング解析の結果に基づいて、CTC 検出用のマイクロチップの流路サイズや、その形状について検討を進めていく必要がある。また、サンプル4とサンプル5の条件で作製した界面においては、図16で示すように、抗体の密度によってローリング速

度の有意な減少が示された。これは、固定化されている密度が増加することで、細胞表面とその相互作用するリガンド-レセプター数が増加し、これにより速度が減少したものと考えている。このような傾向から、一定のリガンド固定化密度界面において、種々の細胞のローリング速度を定量することで、細胞表面レセプターに応じたローリング速度の違いを定量できる可能性を示唆しているものと考えている。

4. マイクロチップの構造・流路サイズの検討

4.1 スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製

フェムト秒レーザー加工装置により様々なサイズの流路を掘削する条件の検討も検討した(図17)。この装置により複雑な形状をもつ流路を自在に成形できるが、エッジ部分の精度や、レーザーによる熱変性により、微細で安定した構造を得ることが難しかった。レーザーの照射条件のみならず、冷却条件なども最適化が必要であることから、チップ基板を作製できる技術をもつ企業に依頼して、オーダーメイドマイクロチップを構築する方針がよいと判断した。

4.2 マイクロ流路構造の設計と作製

市販のマイクロチップを用いた

予備実験から、マイクロチップのサイズが及ぼすローリング効率の影響について検討することができた。そこで、マイクロ流路幅を 300 μm 、深さ 150 μm のサイズとした。これにより、細胞がリガンド固定化界面に対して一定に相互作用できる確率が向上し、効率的な分析につながるものと考えられる(図18、19)。また、細胞ローリングを一定量の細胞検体において観察するためには、一定量の細胞をマイクロ流路内へ誘導することが必要である。このような問題に対して交差型の流路構造を設計し、圧力で液体の微量な液体をコントロールできるポンプシステムを接続した。交差型構造を持つことでその部分の体積の細胞がマニピレートできる(図18)。このような構造を基礎骨格として設計すれば、必要な液体量を正確に細胞ローリング検査用流路へと導入することが可能となる。また検体となる細胞懸濁液を循環させておいて、1回目の分析終了と同時に、再びコンピュータの圧切り替えにより、検体分析流路へと細胞懸濁液を導入することができる(図19)。コンピュータにより圧の変化と、カメラでの取り込みなどをプログラミングすることで、分析プロトコルを一定にして CTC の解析につなげることが出来る。

4.3 ガラス界面に対する

MPC-BMA-NVF ポリマーの界面固定化の検討

設計した新たなガラス製マイクロチップ界面に対するリガンド固定化剤として、MPC:nBMA の組成は 30:60 と固定し、NVF の組成を 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0 mol 当量とすることで、側鎖のアミノ基導入率が様々になるコーティング剤を設計することができた (表 7)。また、GPC 測定の結果、分子量は約 $3.2 \sim 6.5 \times 10^4$ であり、分子量分布も 1.1~1.3 程度と、極めて狭い分布であることから均一なポリマーを合成することに成功している。このような均一なコーティング剤を用いることで、精密にリガンド導入率をコントロールすることができ、また MPC の組成比も安定することで非特異的な細胞の吸着抑制に繋がるものと期待できる。

次に、このポリマーをガラス界面へ固定化し、接触角の変化を測定した結果、いずれも 3 倍から 4 倍程度の接触角の増加が示された (図 20)。いずれの接触角の増加も、NaOH 溶液によって完全に分解することができ、コーティングしたポリマーを剥離しマイクロチップを再生させる条件も検討した。X 線光電子分光法においてもポリマーが界面に固定化できていることを認めており (図 21、表 8)、接触角のデータも含め、コーティングのキャラクタライゼーションを完了することができた。

4.4 ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路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 22 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。

4.5 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 23 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。

5. 循環がん細胞診断デバイスのプロトタイプの構築とその評価

5.1 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 2 4 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 5 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トし、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 2 6 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 4 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 2 6 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に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 2 6 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、さらに経時的にかかる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。

5.2 ローリング速度解析ソフトのアルゴリズムの検討

ローリング細胞の画像成分のみを抽出する技術は、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、前処理行程において、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

もあ報告されている。さらに、濃度変換とよばれる輝度やコントラストの調製から、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 27 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した。この画像は、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、再構成することで解析用の動画を作成した。これは、動画内の静止ピクセルを完全に除去することができるため、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、二値化において明確にローリング細胞を識別できた。得られた画像を二値化し、ソフトウェア上で輝度の高いピクセルをもつ部分を識別させた。細胞ローリング画像には、一方のエッジからローリング細胞が入り、逆のエッジへと出て行く細胞もある。本ソフトウェアに付属の自動識別機能により、このような

細胞は追跡することができた。

本検討から、細胞ローリングの動画解析におけるアルゴリズムを適応することで、解析動画に対して一定の処理を実施することでヒストグラムを作成でき、有効なデータ解析法が確立できたと考えている。

5.3 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

5.2 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 28 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 28 (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、認識させ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、この範囲内の粒子認識や速度の識別が重要であると考えている。いずれのサイズの粒子においても、にローリングしているものだけを良好に抽出することができた。図 29 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ができた。これにより、速度のばらつきを効率よく識別できる。図 30 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、