

マイクロチップ内部の圧力に対してプロットした。図30ならびに図31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  $\mu\text{m}$ 程度の範囲であっても、送液のずり応力に追随して流速を制御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速度も応答していることから、マイクロチップ内部で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できるシステムであることが考えられる。

#### 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

細胞懸濁液をインジェクトした直後の画像、ならびにその画像の速度解析した時のベクトル表示について図32に示す。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、流路内の場所によらず一定の速度集団をもつ細胞であることが示されており、この機構により一定の速度によって細胞を検出流路へと打ち出すことができた。

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分布を解析した。その結果、流路内の細胞を識別して、速度分布を算出できた(図33)。得られた速度分布のヒストグラムを図34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中に、最もローリング速度分布が遅い「Low velocity cell」の分布も観察された。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評価できる可能性が示唆された。

#### 5.5 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35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

### 1. 非特異吸着を抑制する新規リガンド固定化剤の開発

本プロジェクトでは、血中に存在するレアな細胞集団として知られている循環がん細胞を検出するためのデバイス創成を目指した。検出感度を向上させるためには、マイクロデバイス上での非特異的な細胞吸着・接着を完全に除去する必要がある。我々は、レアな細胞集団を高感度で検出するためのリガンド固定化剤として、ベタイン構造をもつポリマーに着目して検討を進めた。ベタイン系ポリマーは、一般にタンパクなどの非特異吸着を抑制する効果が知られており、スルホプロピルベタインを界面に固定化して、タンパクや血清などの非特異吸着を抑制することも他の研究者により詳細に検討されている。さらに、東京大学の石原教授らが開発したMPCポリマーについては、非常に多くの研究が展開されており、細胞やタンパクの非特異吸着の抑制効果が既に実証されている。本プロジェクトにおいても、ベタイン系ポリマーを採用して、リガンド固定化法について検討した。その結果、いずれのポリマーにおいても細胞の吸着をほぼ完全に抑制している結果を得ることができ、感度低下の原因となる細胞の非特異吸着を抑制できることが確認できた。スルホプロピルベタインの場合、ATRPによる合成経路を検討したので、界面に存在するポリマーの分子量を一定に制御することが可能であり、制御された界面を容

易に作製できた。一方、MPCポリマーでは、ランダム重合で合成しているために、ポリマーの組成や分子量の制御が難しい。しかし一方で、細胞ローリングを誘導するためのマイクロチップ構造は、 $300\ \mu\text{m}$ 程度の流路が最適であることを見出ししており、このような流路内を均一に修飾するためには、ポリマー溶液を流路に流してコーティングする手法が簡便であり、実用的である。このような観点から、MPC-BMA-NVFポリマーは、容易にリガンドをマイクロ流路内部へコーティングでき、さらに細胞の非特異吸着を抑制できるという利点を考慮して、以後の実験に用いた。なお、界面のコーティングについては、分光学的手法において確認できており、固定化したリガンド量についてもラジオアイソトープの実験により定量化することができている。

### 2. リガンド固定化界面の物性評価

リガンド固定化剤として、2種類のポリマーを開発することができ、2つのポリマーについて、リガンド固定化量やコーティングについてX線光電子分光法により検討した。スルホプロピルベタイン構造をもつポリマーの場合は、界面からのグラフト重合であり、一方MPC系ポリマーではコーティングによる界面への修飾を実施した。いずれの場合でも界面において非特異吸着を十分に抑制できるだけのポリマー量を被覆することができた。MPC系ポリマーでコーティングした界面に

おけるリガンド量についてラジオアイソトープにより評価した結果、 $0.84\text{mg}/\text{m}^2$  の抗体の固定化に成功しており、ファンデルワールス半径を考慮した被覆面積から考慮すると10%の界面が抗体で覆われている計算となる。細胞表面には比較的粗な状況でリガンドが存在していることを考えると10%の表面被覆率で抗体を固定化できている場合、十分に細胞ローリングを誘起できるものと考えられる。このような固定化量の定量化からも、合成したMPC系ポリマーを用いて以後の実験を進めることが妥当だと判断した。

### 3. リガンド固定化界面での細胞ローリング挙動

開発したポリマーをコーティングした界面において細胞のローリング挙動を観察した結果、ガラスキャピラリーやマイクロチップ内、いずれのデバイスでもベタインポリマーによる非特異的吸着の完全な抑制効果を認めた。さらに、MPC-BMA-NVFを用いることで、リガンド密度を制御して、界面におけるローリングを検討した結果、リガンド密度に応じてローリング速度を識別できる条件を見出すことができた。細胞ローリングは、固定化リガンドの密度や、細胞表面レセプターの密度、さらには細胞に与える送液からのずり応力によっても最適な条件が異なる。MPC系ポリマーを使うことで、このようなリガンド密度を種々に検討することができ、またいずれの

条件においてもMPCによる細胞の非特異吸着の抑制効果を発揮していることから、マイクロチップの界面コーティングにおいて様々なバリエーションの界面を構築できる可能性がある。これは、チップの設計のみならず、使用できるマイクロポンプの性能の範囲や、ターゲット細胞を効率的に画像で捉えるための条件設定においても、広範囲の条件から検討できる。このプロジェクトにおいては、MPC:BMAの組成比は、30:60程度が最適であったため、その組成のポリマーをリガンド固定化剤として、細胞ローリング解析用チップの作製に用いることとした。

### 4. マイクロチップの構造・流路サイズの検討

細胞ローリングを分析する場合の大きな問題点として、細胞を連続的にインジェクトすると、ローリング速度が早い細胞は、遅い細部より先に流れることになり、細胞同士の衝突頻度が高くなる。検体となる細胞の濃度を低下させる事も考慮したが、この方法では検出するための時間低下になるものと考えられる。本プロジェクトでは、細胞ローリングを効率的に誘起できるようなマイクロチップ構造として、交差型の流路を設計した。交差部分の細胞懸濁液を、チャンネルの流れをスイッチさせることで、効率的に検出側流路へと流す。この流路構造により、チップへ特別な装置系を組み込むことなく、微量の細胞懸濁液をインジェク

トする機構をチップに装備することができた。また、図32の実験でも実証できたように、深さ150 $\mu$ m程度の流路サイズにすることで、細胞全体にCCDカメラをフォーカスすることができ、また、層流の影響による速度のばらつきも無視できる程度であった。深さ150 $\mu$ mと幅300 $\mu$ m、さらにはサンプル流路と検出器側の流路を交差する形状に設計することで、細胞ローリングを観察するためのチップ構造が最適化されたと考えている。

## 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

Fluigent社のマイクロポンプを利用して、チップ内の圧力をコントロールすることにより微量の送液量を制御できるシステムを構築したことで、交差型マイクロ流路内の細胞ローリングを誘起し、実現化することができた。コンピュータ制御による流速の制御や、送液方向をプログラミングすることで、多検体処理、短時間における複数回の細胞インジェクトにも対応することが可能である。また、細胞ローリング画像を自動認識させて、速度を定量化させるためのアルゴリズムについても、画像処理の演算により実現化することができた。図30、31に示されるように、速度を定量化してヒストグラムから、内圧とローリング速度をプロットしても、安定でよい直線近似を示し、細胞ローリングの基礎検討を実施するためには十分な装置精度であると考えている。さらに、す

べての実験成果を合わせて構築したシステムを使うことで、間葉系幹細胞のローリング速度の速度分布をプロットできることも実証された。今後は、種々の細胞や、マーカー発現密度の違う細胞、固定化リガンド密度の違う界面での細胞挙動の違いなど、さらなる研究の展開が図れるものと考えられる。さらに、CTCの標準サンプルを用いた場合でもプロトタイプの装置系、光学系で十分に追跡できることが示された。今後は、臨床で得られた血液検体を用いて、細胞ローリング速度の分布変化、病態と速度分布の違いなど、検体を使った検討へとシフトして、プロトタイプの作製で培った技術を実用化ステージへと展開していきたい。

## E. 結論

本研究プロジェクトでは、細胞ローリングという循環がん細胞が他の組織へ生着して転移するメカニズムを利用して、細胞を識別・診断するための新たな細胞診断デバイスの開発を進めてきた。循環がん細胞のような存在率が極めて低い細胞集団を高感度で検出するためには、デバイス内での細胞の非特異吸着を完全に抑制することが望まれる。我々の研究プロジェクトでは、ベタイン系ポリマーを検討した結果、MPC系ポリマーを用いることで、リガンド固定化のみならず非特異吸着の完全な抑制を達成することができた。同時に、固定化リガンドによって細胞ローリングを誘起できたことから、ガラス製のマイクロチップ

で、MPC-BMA-NVF 系ポリマーにより細胞をマイクロ流路内でリガンド特異的にマニピレートできた。また、微量液体の送液をコンピュータ上で制御するシステムの導入や、画像解析パラメータの検討など、ハードウェアの部分でも実験、検証することで、実用可能な細胞診断システムのプロトタイプの新成にまで到達できたと考えている。現状の装置系では、多検体への対応や、長時間における細胞ローリング速度の定量化などには対応していないが、本プロジェクトで培った技術と基礎データで、産学連携等のプロジェクトにより、さらなる発展を進めていきたいと考えている。本プロジェクトでの研究機関内において臨床データの蓄積と、そのデータとの比較については、実施することができなかった。今後、臨床で得られた検体を用いて循環がん細胞の診断と同時に、MACS法や FACS による定量化データと照らしあわせて、既存のシステムとの比較検討を進める必要があるものと考えている。3年間という限られた時間内でのプロジェクトにおいて、概念として提唱した細胞ローリングによる細胞診断装置の開発が現実化できるステージにまで到達した点については意義深いと考えている。今後も継続して研究を遂行することで、実用的なシステムへと繋げていきたいと考えている。

## 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) 馬原 淳、山岡哲二, Novel cell rolling column for stem cell separation, 1st International cengress on Advanced Materilas 2011 (中国济南) (2011) [国際学会 口頭発表]

2) 馬原 淳、カルロス アグデロ、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用, 第 60 回高分子討論会 (岡山) (2011) [国内学会 口頭発表]

- 3) 馬原 淳, アグデロ カロス, 北野 博巳, 山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (京都) (2011), [国内学会、口頭発表]
- 4) A. Mahara , C. Agudelo, H. Kitano and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conference on Thin Films, 2011 (京都) (2011)[国際学会、口頭発表]
- 5) 馬原 淳、山岡 哲二, 細胞分離技術の現状と新展開, 第 28 回医用高分子研究会 (東京) (2011) [国内学会、口頭発表]
- 6) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka , Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム (横浜) (2011)[国内学会、口頭発表]
- 7) C. Agudero, A. Mahara, H. Kitano, and T. Yamaoka, Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system, Termis-NA 2011 (米国) (2011) [国際学会、口頭発表]
- 8) 山岡哲二, Biomaterials for Stem Cell Transplantation -Cell Purification and Cell Tracking-, 3th Asia Biomaterial Congress (釜山) (2011) [国際学会・口頭発表]
- 9) 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」
- 10) 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」
- 11) 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) 「国内講演、口頭発表」
- 12) 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) 「国内講演、口頭発表」

1 3 ) 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」

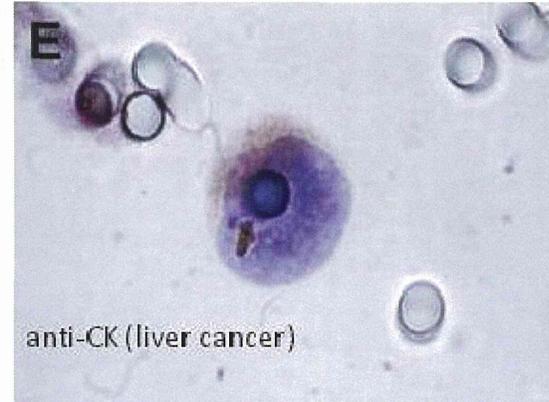
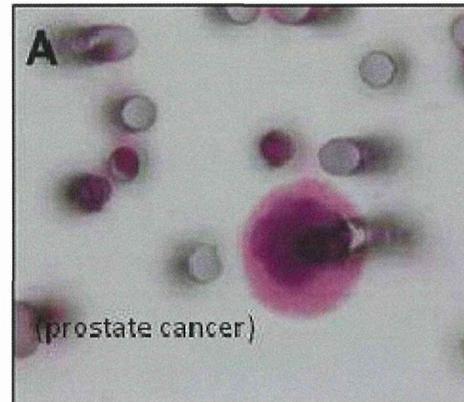
H. 知的財産権の出願・登録情報  
該当なし

1 4 ) 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」

1 5 ) 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」

1 6 ) 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」

(A)



(B)

Characterization  
Surface marker: EpCAM, CD146  
CD176, anticytokeratin (CK)  
Gene expression: ERBB2, SCGB2A2, KRT19,  
MAGEA1, TWIST-1, PBGD

図1 (A) 循環がん細胞と、(B) その特異的な表面マーカーと遺伝子発現

Table 1  
Characteristics of some available methods used to enrich CTC

Systems	Blood volume per test (ml)	Time for enrichment (min)	Principle of CTC enrichment	Method of detection	Type of enriched cells	Sensitivity threshold (cell per blood)	Reported detection of circulating tumor microemboli (CTM)
Oncoquick	15-35	45	Cellular density	Immunolabelling, possible cytopathological analyses	Low density cells	1 cell/4.5 $\mu$ l <sup>a</sup>	No
MACS	5-15	120	Capture of epithelial cells by immunobeads	Immunolabelling, molecular analyses	Cells expressing epithelial antigens	1 cell/0.3 ml <sup>b</sup>	No
CellSearch	7.5	40	Capture of epithelial cells (EpCAM positive) by ferrofluid	Negative selection by CD-45 (leukocytes) Positive selection by CK-8,18,19 (epithelial cells)	Cells expressing epithelial antigens	1 cell/0.5 ml <sup>c</sup>	No
ISET	10	15	Cellular size	Cytopathological analysis, immunolabelling	Cells larger than leukocytes: epithelial cells, tumor cells (and others "rare" cells) <sup>e</sup>	1 cell/ml <sup>d</sup>	Yes <sup>d</sup>

<sup>a</sup> R. Gertler Recent Results Cancer Res. (2003).

<sup>b</sup> C. Griwatz, J. Immunol. Methods (1995).

<sup>c</sup> M. Kagan, J. Clin. Ligand Assay, (2002).

<sup>d</sup> Vona et al. 2000.

<sup>e</sup> "rare" circulating cells: trophoblastic, endothelial and stem cells.

表1 循環がん細胞を enrich するための手法  
(Cancer Letters, 253, 180-204 (2007)より抜粋)

Table 2  
Sensitivity and specificity of different methods used to detect CTCs

Type of enrichment method			Type of detection method <sup>a</sup>			Cancer type (cell line)	Sensitivity <sup>b</sup>	No. healthy subjects (% of positive)	No. patients with benign disease (% of positive)	References
Density gradient	Immuno-magnetic separation (antibodies)	Filtration	RT-PCR (transcript)	qRT-PCR (transcript)	Immuno-mediated detection (antibodies)					
Ficoll	—	—	—	nCK-20	—	Colon (HT 29) Breast (MCF-7)	1–10 cells/3 ml	150 (0)	ND	G. Giribaldi G, J Mol Diagn (2006)
Ficoll	—	—	—	CK20	—	Colon (HT 29)	1 cell/ml	60 (0)	9 (0)	M. Koch, Int. J. Colorectal Dis, 2006; J. Weitz, Clin Cancer Res, 1998
Ficoll	IMS (Ber-EP4/CD-45)	Yes	—	CEA	—	Colon (LS174T)	1 cell/ml	10 (0)	ND	J. Guo, J. Mol. Med. (2004)
Ficoll				ICC (CK-8)		Breast (MCF-7)	1 cell/ml	20 (0)	ND	H. J. Kahn, Breast Cancer Res. Treat (2004)
Ficoll	—	—	—	p1B, PS2, CK19, EGP2	—	Breast (MCF-7)	ND	96 (0)	ND	A.J. Bosma, Clin. Cancer Res. (2002)
Ficoll	—	—	Nested CK-19	—	—	Breast (MCF-7)	1 cell/0.1 ml	54 (3.7)	ND	A. Stathopoulou, J. Clin. Oncol. (2002)
Ficoll	MACS (CD-45, CK-7-8 or HEA)	—	—	—	ICC (pan-CK)	Renal (Caki-1)	1/ml <sup>c</sup>	16 (0)		U. Bilkenroth, Int. J. Cancer (2001)
Ficoll	—	—	Nested PSA	—	—	Prostate (LNCaP)	1/ml	31 (0)	50 (0)	A. Mejean, J. Urol. (2000)
Ficoll	—	—	Nested AFP	—	—	Liver (Hep G2)	1/ml	37 (0)	65 (0)	Louha M, Hepatology, 1997
	MACS (HEA-125)	—	—	Multiplex CEA, CGM2	—	Colon (HT29)	1 cell/0.1 ml	41 (0)	32 (0)	R. Douard, Clin. Chem. Lab. Med. (2005)
DG	MACS (CK)	—	—	—	ICC (HER-2)	Breast	ND	15 (0)	17 (0)	P. Wulffing, Clin. Cancer Res. (2006)

表 2 – 1 循環がん細胞を検出するための手法  
(Cancer Letters, 253, 180-204 (2007)より抜粋)

	Ferrofluid (EpCAM) <sup>d</sup>				IF (CD45,CK8, CK18, CK19)	Breast (SKBR-3)	1 cell/0.5 ml <sup>c</sup>	145 (0.1)	200 (0.1)	M. Cristofanilli, N Engl J. Med. (2004); W. J. Allard, Clin. Cancer Res. (2004)
Lymphoprep	Dynabeads (Epithelial antibodies)		Nested CK-19, CEA			Colon	ND	25 (CEA = 4) (CK-1 = 20)	ND	J. M. Silva, Gut (2002)
Lymphoprep	—	—	Nested SCCA	—	—	Oesophageous (KYSE-273)	1cell /0.1 ml	19 (0)	3 (0)	J. Kaganoi, Br. J Surg. (2004)
			Nested PSMA			Prostate (LNCap)	1cell /ml	ND	71 (2.8)	N. Hara, Clin Cancer Res. (2002)
Ficoll	IMS (BerEP4)	—	Telomerase-PCR-ELISA			Breast (MCF-7)	1.23 /ml	9 (0)	ND	Soria J C, Clin Cancer Res (1999)
		—	Cytopathological analysis			Liver (HepG2)	1/ml	46 (0)	69 (0)	G. Vona, Hepatology (2004); G. Vona, Am. J. Pathol. (2000)
		—			ICC (KL1)	Breast (MCF-7)	1 cell/ml	40 (0)	ND	P. Pinzani, Hum. Pathol. (2006)
Oncoquick	—	—		—	ICC (CD45,CK8,18,19)	Breast (MCF-7)	1/72 microliters <sup>f</sup>	25 (8)	ND	V. Muller, Clin. Cancer Res. (2005)
Erythr lysis	—	—	CEA	—	—	Colon (HT 115)	1 cell/ml	70 (2.9)	ND	R.Q.Wharton , Clin Cancer (1999); S. Jonas, Gut (1996)
Erythr lysis	—	—	hMAM	—	—	Breast (SKBR5)	1cell/0.1–1 ml	27 (0)	41 (5)	O. Zach J. Clin. Oncol. (1999)
			membrane array assay			NSCLC (H358)	1cell/0.2 ml	100 (6)	47 (17)	C.C.Sheu, Int. J. Cancer (2006)
Ficoll	—	—	Semi quantitative AFP	—	—	Liver (HepG2)	1 cell/0.6 ml	ND	10 (0)	I.H. Wong, Clin. Cancer Res. (1999)

(continued on next page)

表 2 - 2 循環がん細胞を検出するための手法  
(Cancer Letters, 253, 180-204 (2007)より抜粋)

Table 2 (continued)

Type of enrichment method			Type of detection method <sup>a</sup>			Cancer type (cell line)	Sensitivity <sup>b</sup>	No. healthy subjects (% of positive)	No. patients with benign disease (% of positive)	References
Density gradient	Immuno- magnetic separation (antibodies)	Filtration	RT-PCR (transcript)	qRT-PCR (transcript)	Immuno-mediated detection (antibodies)					
—	—	—	CEA	—	—	Colon (SW-480)	1 cell/0.2 ml	30(0)	ND	J.Y. Wang, World J. Surg. (2006)
Erythr Lysis	—	—	—	—	IF (HEA) (LSC)	Breast (MCF7)	1 cell/ 2 µl	100(3)	25(0) <sup>h</sup>	K. Pachmann, Breast Cancer Res. (2005); K. Pachmann, Clin Chem. Lab. Med. (2005)

Ab, antibodies; AFP, a-fetoprotein; CEA, carcinoembryonic antigen adhesion molecule 5 (CEACAM5); CGM2, carcinoembryonic antigen adhesion molecule 7 (CEACAM7); CK, cytokeratin; Erythr Lysis, Erythrocyte lysis; HER-2, proto-oncogen product; HEA, human epithelial antigen; hMAM, mammaglobin; ICC, immunocytochemistry; IF, immunofluorescence; IMD, immunomediated detection; IMS, immunomediated separation; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; LCS, laser scanning cytometry; MACS, magnetic-activated cell separation; ND, non-determined; No., number; PSA, prostate-specific antigen; PSMA, prostate-specific membrane antigen; SCCA, squamous cell carcinoma antigen; NSCLC, non-small cell lung cancer; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR, quantitative RT-PCR.

<sup>a</sup> Original methods are in box.

<sup>b</sup> Sensitivity threshold, presented as cell per maximum volume of blood still giving a signal.

<sup>c</sup> Recovery rate 84%.

<sup>d</sup> CellSearch.

<sup>e</sup> Recovery rate 85%.

<sup>f</sup> Recovery rate 70.6%.

<sup>g</sup> Prostatitis.

<sup>h</sup> Non-epithelial haematological malignancies.

## 表 2 - 3 循環がん細胞を検出するための手法 (Cancer Letters, 253, 180-204 (2007)より抜粋)

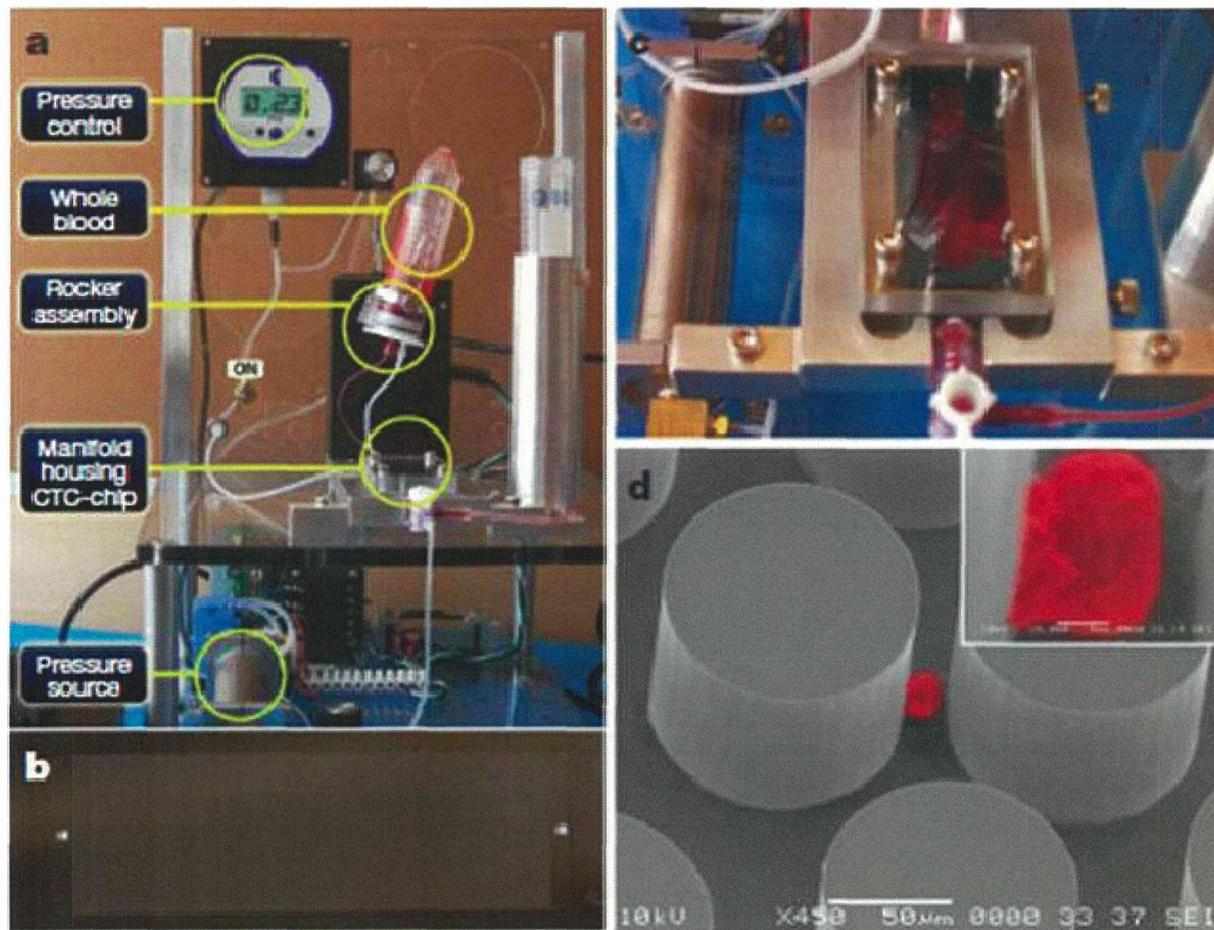


図2 循環がん細胞をキャプチャーするマイクロチップデバイス  
(Nagrath S, et al. Nature 450, 1235 (2007)より抜粋)

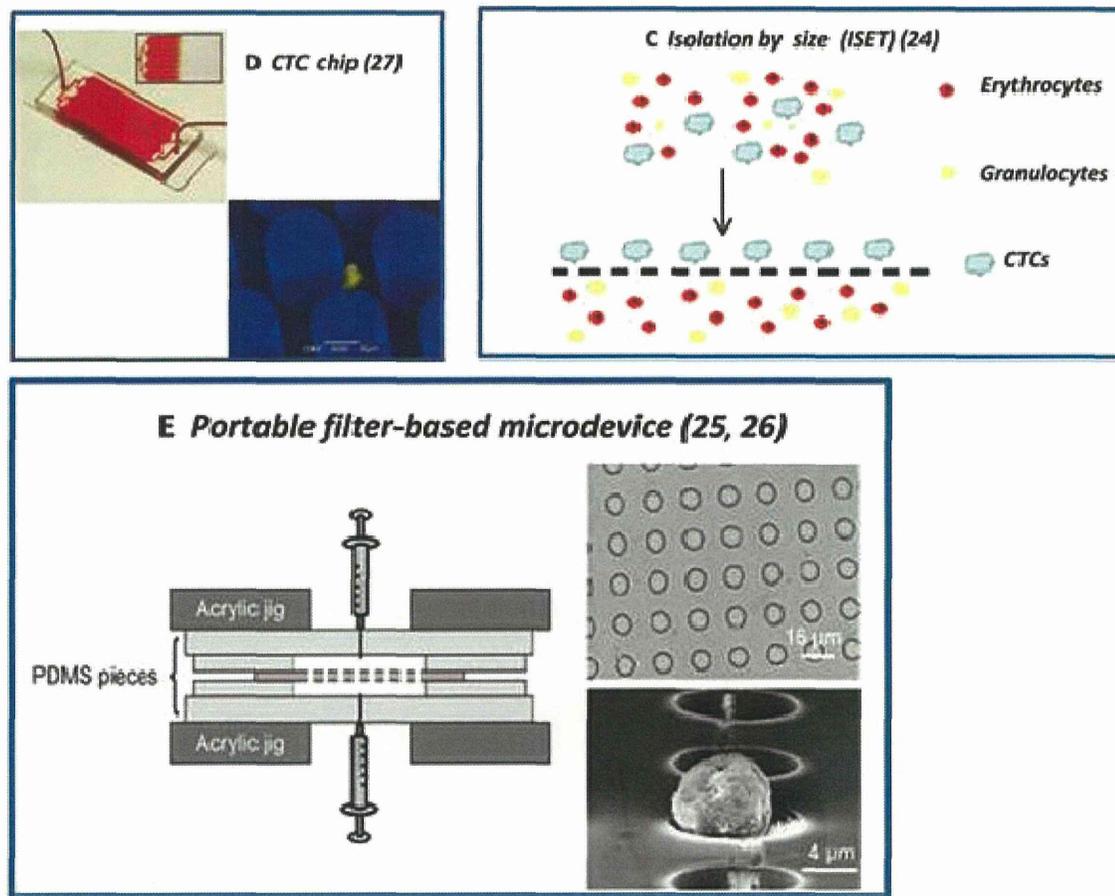


図3 様々な手法により循環がん細胞を検出するマイクロチップ  
(Clinical Chemistry, 57, 1242-1255 (2011))

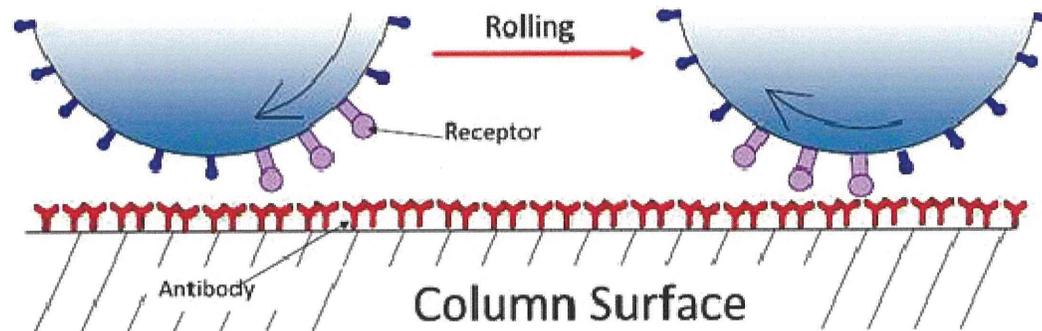
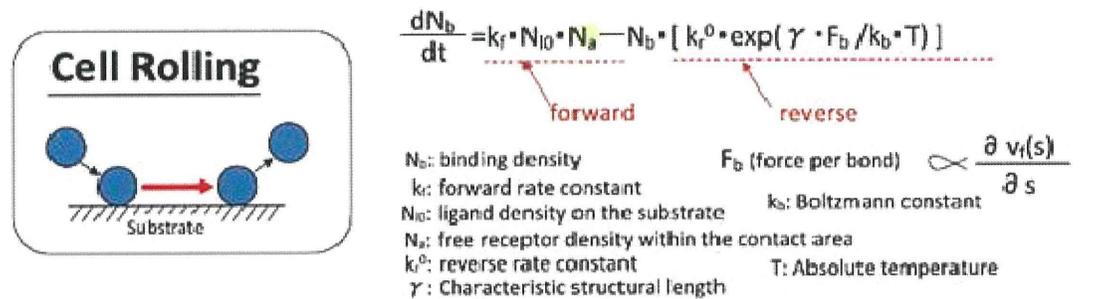


Fig. 1. Cell rolling on the antibody-immobilized solid surface.

図4 固相界面上に固定化されたリガンドに対する細胞ローリング機構  
 (Mahara A., T Yamaoka Reactive & Functional Polymers 71, 362 (2011))

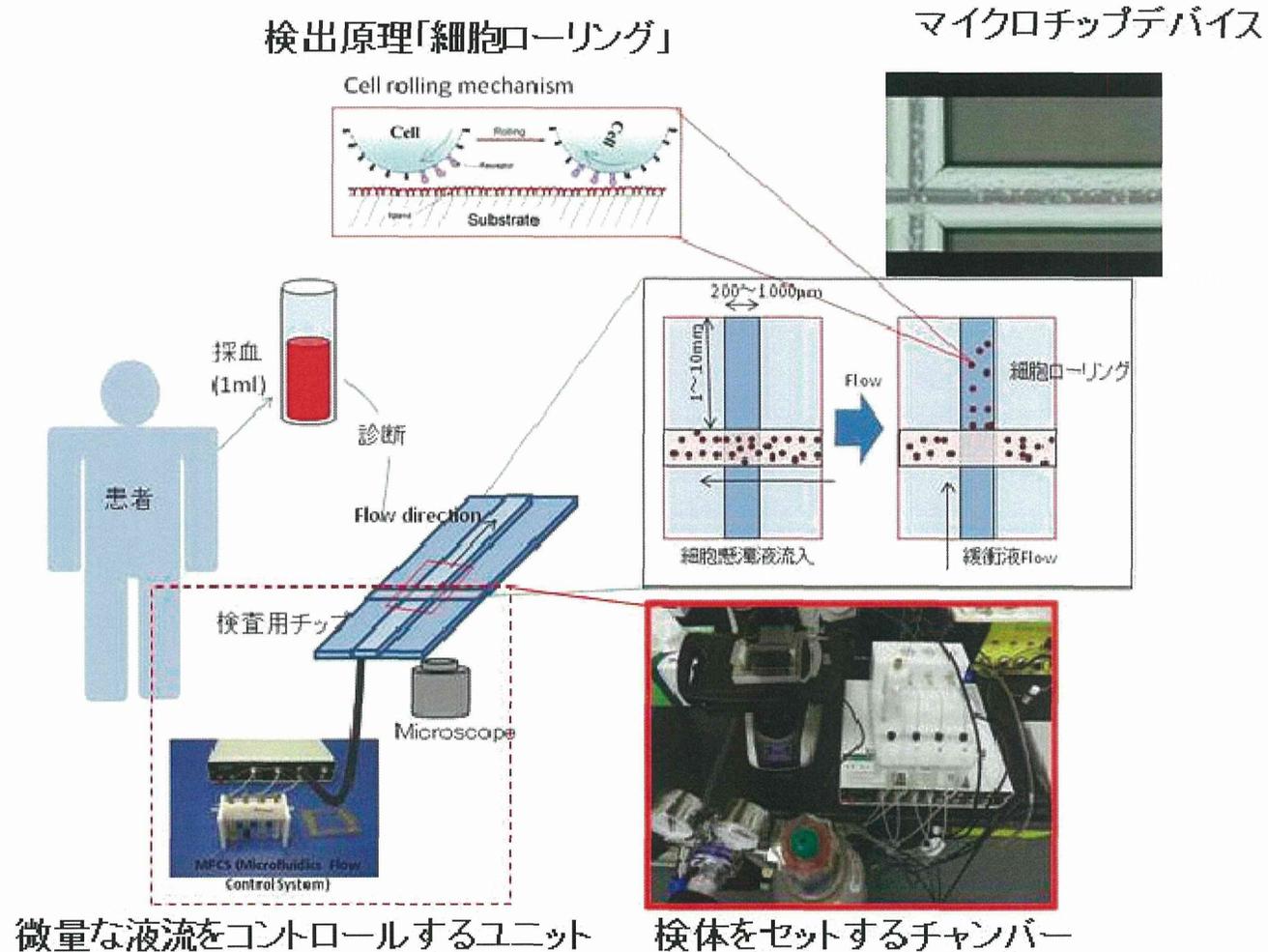
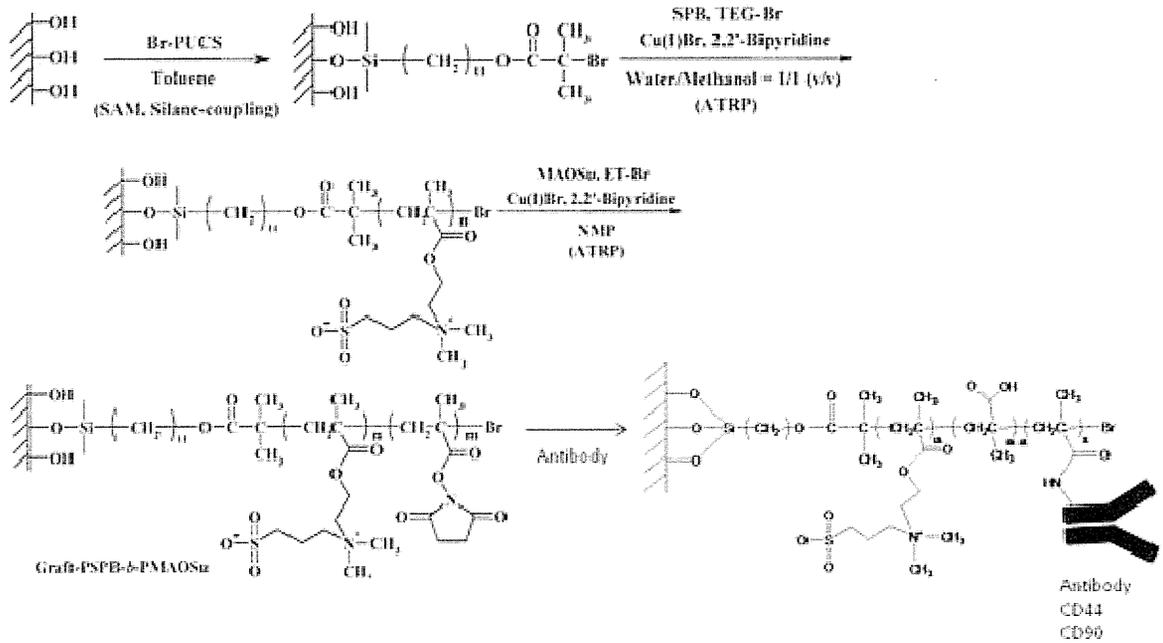


図5 本研究プロジェクトで目指したリガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞診断デバイス

(A)



(B)

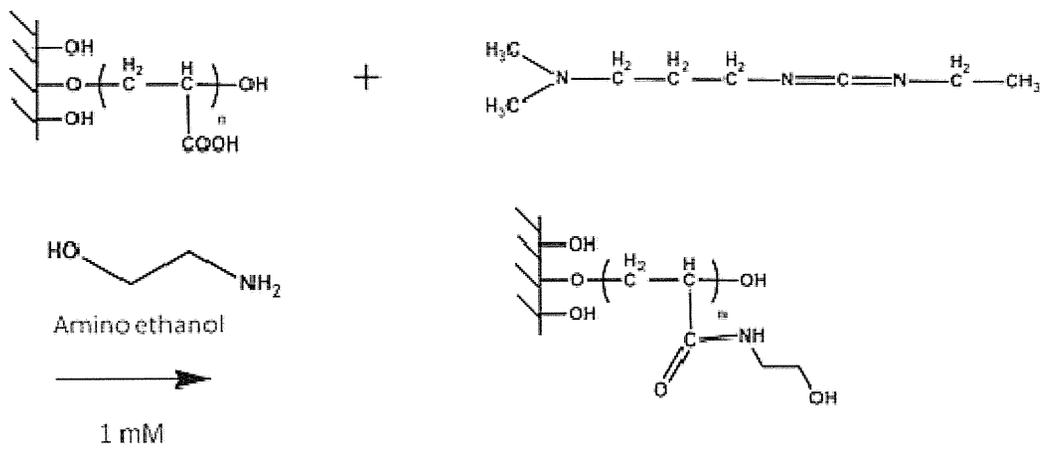
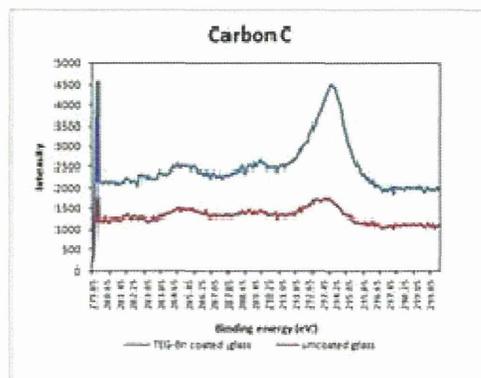
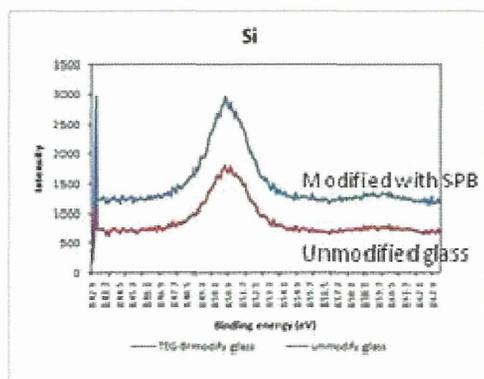


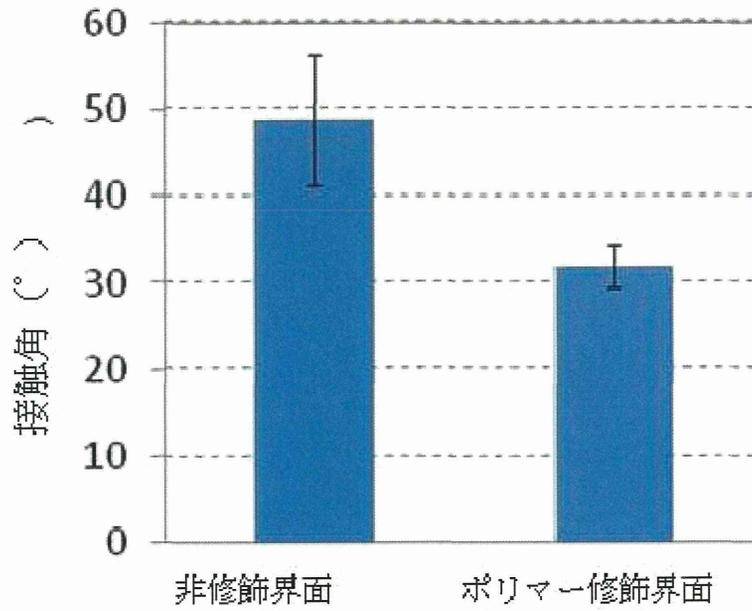
図6 (A)原子移動ラジカル重合によるガラス表面でのスルホプロピルベタインポリマーの合成と抗体固定化反応、  
(B)ガラス界面に対するポリアクリル酸の重合反応



	Non-mod.	Mod. by SPB	Mod. by CD90
N/C	0	0.088	0.235
Si/C	2.663	0.028	0
S/C	0	0.072	0.061
O/C	27.76	1.133	1.217
Br/C	0	0	0
N/O	0	0.077	0.193
Si/O	0.096	0.025	0
S/O	0	0.063	0.051
C/O	0.36	0.882	0.082
Br/O	0	0	0

図7 スルホプロピルベタインをガラス界面へ重合した後、X線光電子分光法により界面における原子組成を解析した結果

(A)



(B)

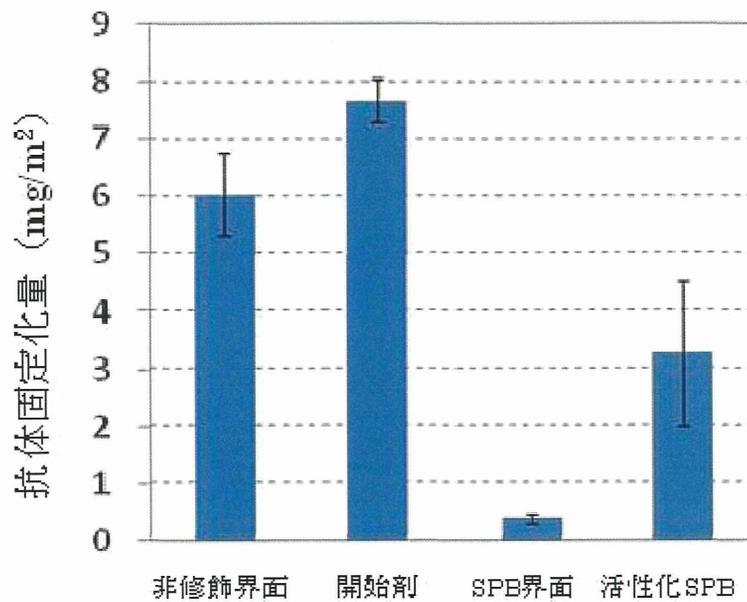


図8 (A) スルホプロピルベタイン (SPB)修飾後の水接触角と (B) ラジオアイソトープによる抗体固定化量の定量結果