

多能性幹細胞の分離を効率化するための前処理チップの開発

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

(国) 富山大学医学薬学研究部 小池千加 二階堂敏雄 (国) 京都大学 古賀毅

1. 緒言

分化した成熟細胞を未分化状態に戻すことでできる幹細胞とその再生医療への応用についての研究が大きく注目されている一方で、私たちの体の中にも、ES細胞やiPS細胞と似た性質を示す多能性幹細胞が存在することがわかっており、これら体細胞中の幹細胞を活用する研究も盛んに行われている。これらの幹細胞を再生医療に応用する上で、多数の細胞の中に微量に存在する幹細胞を分離回収する技術が重要となる。現状では、フローサイトメーターを用いた分離が行われているが、装置価格が高価である上に、細胞を効率よく回収するには高度な知識・技術が必要である。そのため、多能性幹細胞の研究をさらに加速させるには、マイクロチップ等を用いた簡便な分離回収方法を開発する必要がある。本研究では、マイクロチップを用いて幹細胞を分離する際の前処理用のチップとして、小さい夾雑物等を除去することのできるマイクロチップの開発を行った。

2. 実験方法

2.1 チップ作製

文献¹⁾のチップ構造を参考にしてフォトマスクを設計し、そのフォトマスクを使ってセンター内の設備で樹脂チップ成形のためのシリコン製鋳型を作製した。次に、このシリコン製鋳型を用いて、これまでに開発した紫外線硬化樹脂および成形方法を用いて樹脂製マイクロチップを成形した。

2.2 細胞分離実験

培養細胞として、食道がん由来細胞株である KYSE510 を用いた。培養した細胞をトリプシン処理により回収した後、(細胞の軌跡の観測では)フルオレセインにより蛍光標識し、送液バッファーに懸濁させた。送液バッファーは 0.5% BSA、2mM EDTA を含んだ PBS を用いた。細胞の軌跡の観測では、シリンジポンプにより流速 20 μ L/min で細胞懸濁液を送液し、流路を流れる蛍光標識細胞を青色光で励起し、露光時間を 0.5 秒として撮影することにより細胞の軌跡を観測した。また、細胞数の計測では、流速 200 μ L/min で細胞懸濁液を送液し、回収または排出された液中の細胞数を血球計算盤で計測した。

3. 実験結果および考察

作製したチップ流路の光学顕微鏡像を図 1 に示す。微細な円柱が規則正しく配列した構造が確認できた。この柱の直径は 70 μ m、高さは 50 μ m、柱間のギャップは 30 μ m である。昨年度の結果²⁾から、柱の直径がより小さく、よりアスペクト比の高いチップについて詳細な形状確認を行い、この成形方法で問題なく成形できることがわかったため、本研究では光学顕微鏡での確認のみを行った。

マイクロチップの微細な柱は一つごとにシフトしている。シフト量と柱間のギャップ等で決まるしきい値より大きい細胞は、柱のシフトとともにシフトしていき、液

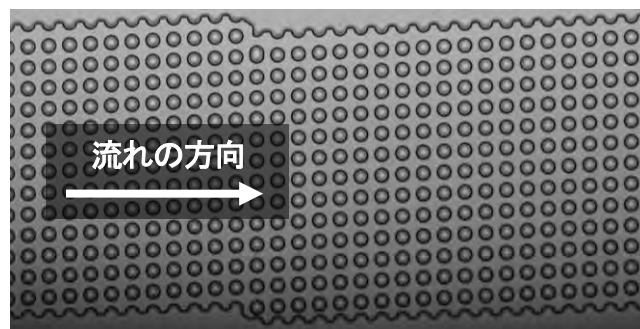


図1 マイクロチップの流路

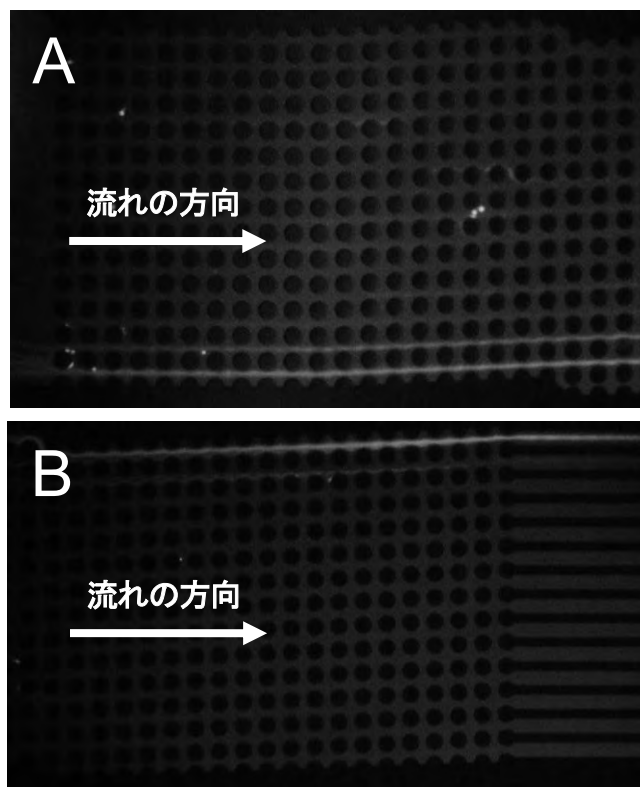


図2 細胞の軌跡 Aは流路の初め部分、Bは流路の終わり部分

の流れの方向に対して斜めに進む。一方、しきい値より小さい夾雑物等は、層流に乗って液の流れの方向に対して平行に進む。本研究では、一列ごとのシフト量が $5\mu\text{m}$ となっており、このチップのしきい値はおよそ $8\mu\text{m}$ となる。

図 2 に、このマイクロチップに蛍光標識した細胞を流した際の細胞の軌跡を示した。流路の初め部分 (図 2A) では、細胞は流路の下側を流れているが、流路を進むにつれて柱のシフトと同様にシフトしていき、流路の終わり部分 (図 2B) では、流路の上側を流れていることがわかる。今回の細胞はしきい値である $8\mu\text{m}$ よりも大きく、このマイクロチップを用いることで、しきい値より大きい細胞の流れをシフトさせて進行方向を変えることができることが分かった。

流路の初め (図 2A) で細胞が一方に偏る現象については、細胞がチップに入る前のチューブの中で、重力により一方向に偏るためと考えられる。

次に、マイクロチップから流出させた液について、液中の細胞の数の計測を行った。流路の終わり (図 2B) では、流路が 14 本に仕切られており、その内、上側の 2 本の流路からの流出液を回収液、下側の 12 本の流路からの流出液を排出液と呼ぶことにする。回収液と排出液の細胞濃度、液量を計測したところ、表 1 のようになった。細胞濃度と液量から細胞数の割合を計算すると回収液中の細胞の割合は 98.5%、排出液中の細胞の割合は 1.5% となり、ほとんどの細胞を回収できていることがわかった。また、それぞれの液量を比較すると、回収液が 0.55mL、排出液は 2.3mL であり、マイクロチップに流入した液体のうち約 20% を回収し、約 80% が排出された。このことは、小さい夾雑物等がサンプルに含まれる場合、その約 80% を排出して除去できることを示している。また、これにより回収液の細胞の濃度をマイクロチップに導入す

る前の液中での濃度の 5 倍程度に高めることができる。

さらに、この結果は流速を $200\mu\text{L}/\text{min}$ とした際の結果である。この流速は、我々の従来型のマイクロチップにおける流速のおよそ 10 倍であり、このマイクロチップによって高速でサンプルを処理できる可能性を示した。細胞を高速で処理した場合には、細胞に対するダメージが懸念される。そこで、回収した細胞の生死をトリパンブルーにより確認すると、回収した細胞の生細胞率は 98.2% であり、細胞に与えるダメージは少ないことが分かった。

表 1 回収液と排出液の細胞数

	回収液	排出液
細胞濃度(cells/mL)	83×10^4	0.3×10^4
液量(mL)	0.55	2.3
細胞数割合(%)	98.5	1.5
生細胞率(%)	98.2	—

4. 結言

開発した前処理用の樹脂製マイクロチップにより、目的の細胞と小さい夾雑物とをサイズによって分離できることが分かった。これにより今後は様々な細胞へとこの前処理チップを応用していくことができるようになった。

参考文献

- 1) A. Davis J. A. *et al.* PNAS **103**, 14779-14784 (2006)
- 2) 富山県工業技術センター研究報告 **27**, 92-93 (2013)

謝 辞

終わりに、本研究推進にあたり、培養細胞のご提供と数多くのご指導を頂きました京都大学 嶋田 裕 准教授に深く感謝致します

キーワード：マイクロ流体デバイス、紫外線硬化樹脂、細胞分離、幹細胞

Development of Polymeric Microfluidic Devices for Debris Removal in Cell Separation

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Chika KOIKE, Toshio NIKAIDO (University of Toyama)

Tsuyoshi KOGA (Kyoto University)

Microfluidic devices which could be used for size-based cell separation and recovery were developed using new UV curable resin. We carried out separation tests using cancer cell line and showed that these cells were successfully separated by our microfluidic chips. These chips could be used in a pretreatment of cell suspension before immuno-affinity based cell separation or other separation methods. In comparison with conventional silicon chips, the use of this polymeric chip can drastically reduce the cost of such separation system.