

ダメージレスを目指す 新しいフローサイトメーターの開発

古河電気工業株式会社 第一生産技術開発センター

徐 傑 月井 健 高橋 享 小相澤 久

Development of New Flowcytometer for Damage Less Sorting

Xu Jie, Tsukii Ken, Takahashi Toru, Koizawa Hisashi

Production Engineering Development Center, The Furukawa Electric Co.,LTD

1. はじめに

生細胞，特に幹細胞・癌幹細胞(cancer stem cells)に関する研究は，再生医療や癌の発生メカニズム解明及びテーラメード医療等の実現に極めて重要である。稀にしか存在しない幹細胞・癌幹細胞を良質に得るシステムの完成は，熾烈な競争が広げられている世界中の研究者に切望されている。例えば，米国の加州だけでも，今後十年間に30億ドルの巨額研究投資を幹細胞の研究に投じることが決定されており，幹細胞関連の研究開発機器の需要が世界規模で益々高まると考えられる。本開発は，今日の情報革命を支えている光通信分野で培った光制御・半導体レーザ・光ファイバ・精密加工などのコア技術を生かし，幹細胞等の研究という異分野である生命科学に寄与する生細胞のダメージレスソーティングの特徴を持つ新しいフローサイトメーターを目指している。

フローサイトメーターは，細胞1個1個の相対的大きさや形状，内部構造の違い，さらに蛍光標識を行うことにより蛍光強度や蛍光の種類を測定し，細胞の同定や細胞群を構成する

種々の細胞の存在比を短時間で解析することができる。また，DNAやタンパク質，カルシウムなどを定量的に染色する蛍光色素により細胞内での存在比などを分析することができる。細胞分離機能を持つフローサイトメーター（セルソーター）により，細胞の大きさや蛍光などの条件に基づき，細胞を生きたまま分離できる。新版フローサイトメトリー自由自在¹⁾という著書にそれらの原理と機能が詳細に解説されている。

本開発の特徴としては，シース容器にレーザ照射用及び蛍光等の情報検出用光ファイバを直結することで，一切の無駄な空間を介さない全く新しいフローサイトメーターの構成原理を実現しました。この構成によって，フローサイトメトリーとして世界で始めて透過光と後方散乱光の情報を新たに取得することを可能としている。今後，前記透過光及び後方散乱光の情報解析が，細胞における分子生物学的な解釈に有益な可能性を示してくれることを期待している。

また，前記透過光情報の活用と高精度の流速制御により，生細胞へのダメージレスソーティングを実現する為に，従来のソーティングプロセスで用いられる超音波による液滴形成と高電圧による液滴荷電方法を全く使用しない，細胞の新しいソーティング方法を導入している。今後，生細胞へのダメージレスソーティング精度

〒290-8555 市原市八幡海岸通り6番地
TEL 0436-42-1636
FAX 0436-42-9334
E-mail: xu@ch.furukawa.co.jp

と能力の向上により、ソーティングプロセスのダメージに弱い、特に分化・誘導を必要とされているデリケートな幹細胞等の研究に寄与できることを期待している。

2. ファイバ式フローサイトメーター

図1には、光ファイバ式フローサイトメーターの光学系構造を示している。従来の空間結合による光学レンズ系の構成と異なって、励起光と受光機能を担う光ファイバの端面が、シースフローを囲む壁の一部として設けられているのが大きな特徴であり、これによって、空気を介在させずに高感度計測できることと、流路の中心に精度良く固定された光ファイバが、従来必要とされる光軸調整の煩雑な作業を省くことができた。また、計測対象である細胞が、受光側の光ファイバ端面と百マイクロメートル程度しか離れていない為に、従来の前方散乱光の代わりに透過光と、後方散乱光という二つ新しい計測情報を取得することを可能としている。これらの情報が、今後の細胞解析に新たな可能性を示唆できることが期待されている。

図1に示された光学計測系では、細胞を解析するために透過光と後方散乱光以外にも、側方散乱光及び幾つかの蛍光情報を取得できる解析機能を備えられている。流路の制御技術としては、計測対象である細胞を含む数十マイクロメートルのサンプル流は、計測感度と精度を維

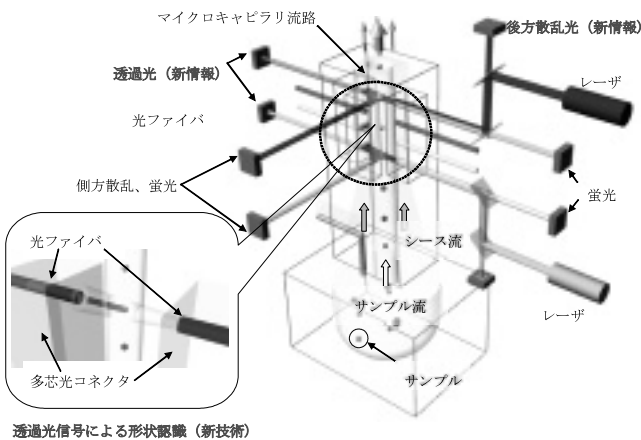


図1 光ファイバ式フローサイトメーターの光学系構造

持する為に、フローセル（キャピラリ）の中心に正確且つ安定的に流す必要があるため、その周りに二、三百マイクロメートル程度のシース流を形成する技術を用いている。

図2は、図1に示す光学系を用いて、八種類の異なる蛍光強度を持つ蛍光ビーズ (8 peaks Rainbow Calibration Particles) を計測した結果である。図2の結果から分かるように僅か100蛍光分子を持つ蛍光ビーズの計測を可能とし、計測感度は、100 MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) に達している。

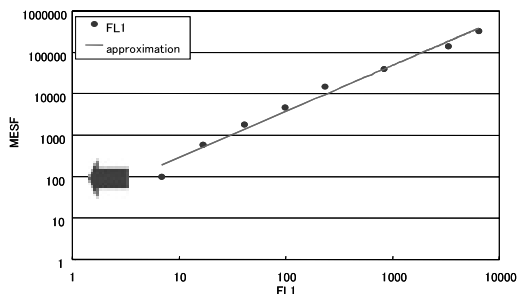


図2 蛍光感度の計測結果

フローサイトメーターは、細胞の遺伝子情報や形状情報を解析する機能以外にもう一つ大きな用途としては、細胞のソーティング機能がある。従来のフローサイトメーターでは、まず、超音波によって大きさ数十マイクロメートルの水滴を形成し、ターゲット細胞を含む水滴に100Vの電荷を付与することによって、落下される水滴が、左右に配置される正、負7000Vの電圧板に細胞を振り分けてソーティングしている。この従来のソーティング方法では、前記の超音波と高電荷のプロセスが、生細胞にダメージないしストレスを与えることが懸念され、特に分化・誘導を必要とする幹細胞のソーティングには、改善が切望されている。

図3には、透過光、後方散乱光、側方散乱光及び幾つかの蛍光情報を計測することによって、特定されたターゲット細胞を所定位置に、例えば96ウエルブ

レートのあるウェルにソーティングする原理の概要図を示している。この原理による細胞ソーティングは、特に再生医療に期待される幹細胞のようなデリケートな生細胞に、限りなくソーティングによるダメージレスが得られる大きな特徴がある。幹細胞のダメージレスソーティングは、例えば再生医療に必要とされる肝臓や脳などの組織に幹細胞の分化・誘導を導くプロセスに極めて重要な意味を持っている。

図3に示す本開発のソーティングの原理としては、まず、細胞の流れ方向に精度良く配置されている複数の光ファイバによって、通過するターゲット細胞の流速を正確に計測し、この流速情報を元にターゲット細胞がノズルの出口に到達する時間を算出することによって、ノズルの先端を廃液槽から、96ウェルプレートの所定のウェルに移動し、該当ターゲット細胞をソーティングする。この方法では、細胞にダメージを与えるような超音波と高電荷のソーティングプロセスが全く使用されていないため、生細胞にとっては限りなくダメージレスを実現している。また、このソーティング方法では、単一のウェルに単一の細胞をソーティングできることから、特に幹細胞の研究に寄与できると期待されている。

3 フローサイトメーターの応用例

解析機器としてのフローサイトメーターは、細胞周期（細胞は、その性状や生体内での役割に応じて、それぞれ決まった周期で細胞分裂を繰り返し増殖している。この、一回の分裂増殖の周期を細胞周期と呼ぶ）やアポトーシス（多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種である）等の細胞解析の研究に不可欠であると同時に、臨床上に特に血液細胞の特定などに重要な意味を持つ。例えば、肝炎やエイズ等の疾患には、免疫細胞の変化が極めて重要な指数として捉えられている。

フローサイトメトリー法によるヒト末梢血リンパ球サブセット検査は、臨床上に重要な意味を持つ。ヒト末梢血リンパ球は種々の疾患や薬剤投与により増減する。T細胞とB細胞はおの細胞性免疫と液性免疫を担い、とりわけT細胞は免疫応答の中核として重要である。したがって、血液・免疫性疾患、アレルギー性疾患や感染症において、両者の動向を知ることは診断・治療のうえで不可欠となってきた。Tリンパ球は、胸膜由来のリンパ球で、主として遅延型過敏反応、移植片対宿主拒絶反応などに代表される、細胞性免疫を司る細胞である。臨

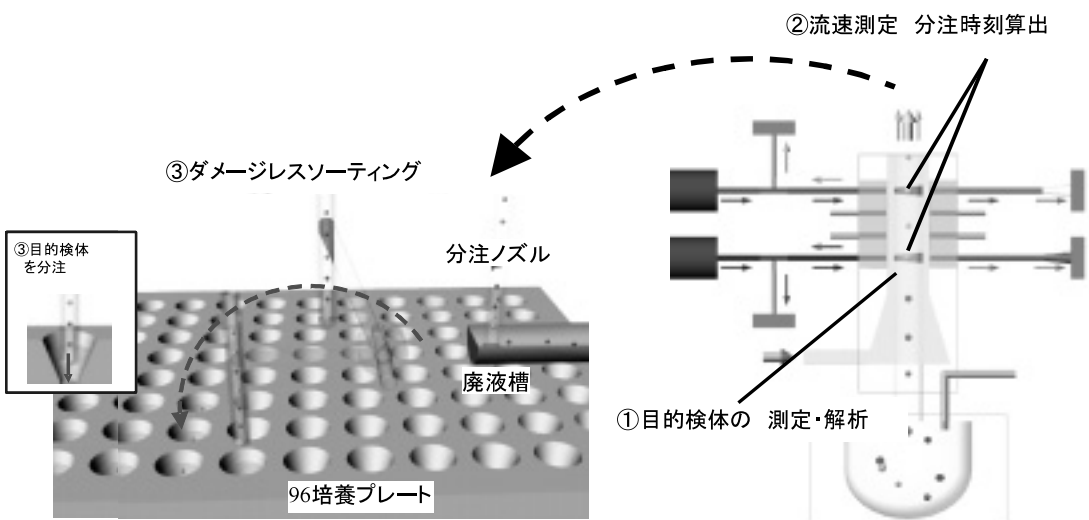


図3 ダメージレスソーティング原理概念図

床検査で検索される頻度が高いのはCD3（成熟Tリンパ球総数）、CD4（免疫補助Tリンパ球, helper T cell, Th）、CD8（免疫抑制Tリンパ球, supressorT cell, Ts）である。

図4は、Ficoll-Paque比重液を用いた遠心分離により赤血球や顆粒球が取り除かれたヒト末梢血リンパ球サンプル（Peripheral Blood Mononuclear Cells）に対して、透過光と側方散乱光の計測情報によるリンパ球と単球の解析結果を示し、従来の前方散乱光と同様に新しく開発した透過光の情報も同様な解析を可能としていることを示している。また、図5は、前記リンパ球細胞に対して、抗体CD4（蛍光色素FITC染色）とCD8（蛍光色素PE染色）によるヒト末梢血リンパ球サブセットの計測結果を示している。

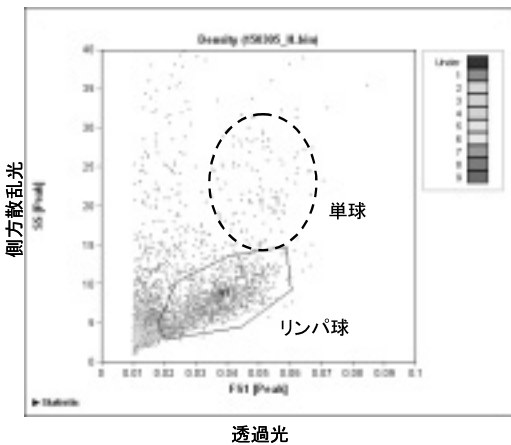


図4 透過光と側方散乱光によるリンパ球と単球の解析結果

ソーティング機器としてのフローサイトメーターは、分化・誘導を必要とされる生細胞、例えば幹細胞にとっては、ソーティング速度よりもソーティングのダメージ度合いが最も重要なファクターとなる。図3に示すソーティング原理では、高精度に流速によるソーティングの時間を算出できることから、従来のソーティングプロセスに採用された超音波や高電荷等の手法を回避し、最も生細胞にダメージを与えない方式と言え、その実験例の一つを図6に示

す。

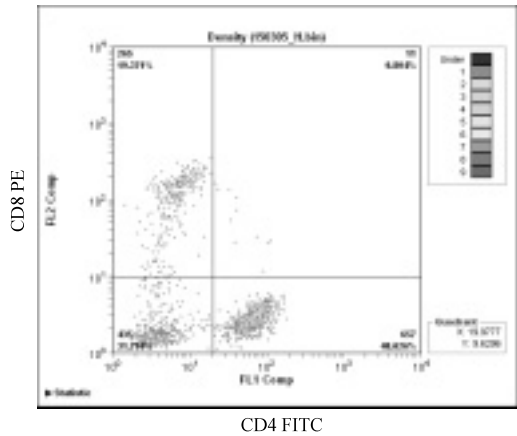


図5 ヒト末梢血リンパ球サブセットの計測結果
Neurosphere法により20日間培養

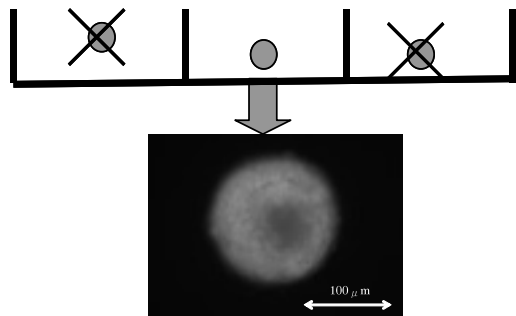


図6 ソーティングされた単一脳神経細胞からのコロニー

機能を失った脳の細胞組織を再生するために、脳の神経冠幹細胞を効率よく得ることが重要である。図6は、マウスの受精卵に緑の蛍光蛋白質発現できる遺伝子プロモーターを注入したマウス胚（受精後9.5日）の脳組織を取り出し、96ウエルプレートに単一細胞を単一ウエルにソーティングし、約二十日間の培養で形成される細胞コロニーを示している。この結果から分かる様に極めてデリケートな脳神経細胞を我々の装置でソーティングしても、単一細胞がコロニーと成長でき、ダメージレスであること示唆している。

4 まとめ

図 7 に、我々が開発している二つのフローサイトメーターを示している。左側の機種は、解析機能のみであるが、二つのレーザを搭載し、四色の蛍光 (FITC (GFP), PE (PI), PeCy 5, APC) と透過光、後方散乱光及び側方散乱光が計測できる。また独自の光ファイバ式光学系を採用することによって、極めてコンパクト化を実現している。右の機種は、解析機能を持

ちながら、単一ウエルに単一細胞をダメージレスでソーティングできる特徴を持っている。また、PERFLOW の名前には、高価なイメージを持たれた従来のフローサイトメーターに対して、各研究室でも普及できるようにパーソナルフローサイトメーターの意味を込められている。今後、透過光やダメージレスソーティング等の特徴を生かされ、ライフサイエンス科学の発展に寄与できることを期待している。



PERFLOW ANA



PERFLOW SORT

図 7 パーソナルフローサイトメーター

謝辞

本研究の一部は、平成 17 年 NEDO 次世代戦略技術実用化開発助成事業によって行われている。

参考文献

- 1) 新版フローサイトメトリー自由自在 2005 主編 中内 啓光 秀潤社発行