

細胞の分離・選抜のためのマイクロ流体デバイス

山田 真澄*・関 実

はじめに

一般的な細胞生物学の実験、診断医療や再生医療、バイオプロセスにおける有用細胞株の育種などの幅広い分野において、複雑な細胞集団から特定の細胞を選抜する操作は不可欠であると言えよう。たとえば血液中にごくわずかに存在する循環がん細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) を分離し、その特性評価を行うことで、がんの転移性の予測や治療効果の評価などが可能となると期待されている。また、近年研究が非常に活発になされている再生医療分野においては、iPS細胞などの幹細胞から分化させた特定の細胞を使用する際に、がん化の危険性がある未分化の細胞を効率的に除去する必要がある。これらの例に示されるような細胞選抜を行うために、現在さまざまな手法が用いられている。もっとも一般的な手法の一つとして、細胞のサイズあるいは比重の差を利用した遠心分離があげられる。しかし、遠心分離では特殊な装置や操作を必要としない一方で、十分な分離精度や回収率が達成されるとは言い難く、たとえば、希少な細胞をロスなく回収することは困難である。一方、特定の細胞の表面に存在するマーカー分子を抗体によって標識して選抜する手法として、蛍光標識によるフローサイトメトリー (FACS) や、磁気細胞分離 (MACS) などでも広く用いられている。中でもFACSは、細胞の種類や性質の分析と、希少細胞の選択的分離のために頻繁に用いられる強力な手段である。しかしながら、複雑な光学系やシグナル処理、非常に高価な装置などが必要であるため、現時点では、個々の研究室や医療機関において一般的に用いられている手法であるとは言い難い。以上のような背景から、幹細胞生物学や再生医療の発展とともに、特定の細胞を正確かつ簡便に選抜するための手法が広く求められており、そのための手段の一つとしてマイクロ流体デバイスと呼ばれるシステムが注目を集めている。マイクロ流体デバイスを用いた細胞分離に関する研究例は近年多数報告されており、また解説記事もいくつか出版されてはいるが¹⁻³⁾、本稿ではマイクロ流体デバイスの発展から、細胞の選抜手法に関する最近の応用例と実用化に向けた今後の展望を簡単に紹介したい。

マイクロ流体デバイスの発展

マイクロ流体デバイスとは、半導体微細加工技術や精

密機械加工技術を応用して作製された、深さ・幅が数 μm ～数100 μm 程度の流路構造を有する小型の実験装置である。1990年代より活発に研究されるようになってきたが、当初は主に液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動の微小化・高速化を目的とした研究が主流であった。また、化学工学におけるマイクロリアクターの開発などの研究も当時から行われていた。現在は、タンパク質や核酸などの生体高分子から線虫などの微小な動物に至るさまざまな対象を正確に操作するためのシステムとして、幅広い応用が行われている。特にPDMS (ポリジメチルシロキサン) を用いたマイクロ流路構造の作製手法が1990年代後半にHarvard大学のWhitesidesらによって提案されて以来⁴⁾、その応用例は加速度的に増えている。微小なマイクロ流路構造に液体を連続的に導入すると、流れは安定な層流を保つため、流路構造を任意に設計することで、流れのプロファイルを比較的自由に制御することが可能である。また、細胞と同程度の大きさの流路構造を用いれば、その内部で細胞の存在は無視できなくなる。そのため、マイクロ流路に浮遊状態の細胞を連続的に導入すると、細胞の性質に応じて細胞の流れる方向を制御でき、あるいは壁面との相互作用を増加させることができる。このような利点を利用することで、既存の手法とはまったく異なる原理に基づいた細胞の選抜・精製法が数多く提案されてきた。そしてこれまでに報告された手法の中には、細胞の状態を解析して任意の細胞を選抜するFACSのような「能動的」なシステムだけではなく、ある流路構造に連続的に細胞を導入すると、自動的に分離されて個別に回収されるような「受動的」なシステムも数多くある。

細胞分離を行うための細胞の特性としては、表面マーカー、サイズ、比重といった通常的手法においても用いられている因子のほかに、マイクロ流体デバイスを用いることが効果的な分離因子として、変形能、硬さ、形状、接着性なども利用されている。以下、これらの性質ごとに、細胞分離の原理と応用について概説したい。

サイズに基づいた細胞の選抜

サイズという要因は、細胞を特徴づけるもっとも基本的な要因であると言える。たとえば体細胞として存在する細胞のうち、より未分化で幹細胞に近い性質を有する細胞は、その大きさが他の細胞と比べて小さい場合が多

*著者紹介 千葉大学大学院工学研究科共生応用化学専攻 (准教授) E-mail: m-yamada@faculty.chiba-u.jp

い。例として、角膜輪部上皮細胞中に存在する Side population 細胞は、小さいことが知られており⁵⁾、また肝臓の主要な機能を担う肝実質細胞の中には小型肝細胞と呼ばれる増殖能力の高い細胞が0.1%程度存在していることが知られている⁶⁾。このようにサイズという要因はもっとも重要な細胞の特徴の一つであるが、サイズを基準として細胞を正確に分離するための既存の手法はそれほど多くはない。エルトリエーターと呼ばれる、連続遠心分離による選別装置が用いられる場合もあるが、(筆者の感覚では)それほど広く普及していない。一方で、マイクロ流体デバイスを利用し、サイズによって細胞などの微粒子を連続的かつ正確に分離する手法が10年ほど前から報告されており、新しい手法として注目を集めている。

大きさによる細胞分離機構の例を図1に示す。最初期の例として、マイクロ流路内に規則的に配置されたピラー構造を用いた分離手法がPrinceton大学のAustinらのグループによって2004年に報告された(図1a)^{7,8)}。少しずつずらして配置されたピラー状の構造物の間に細胞

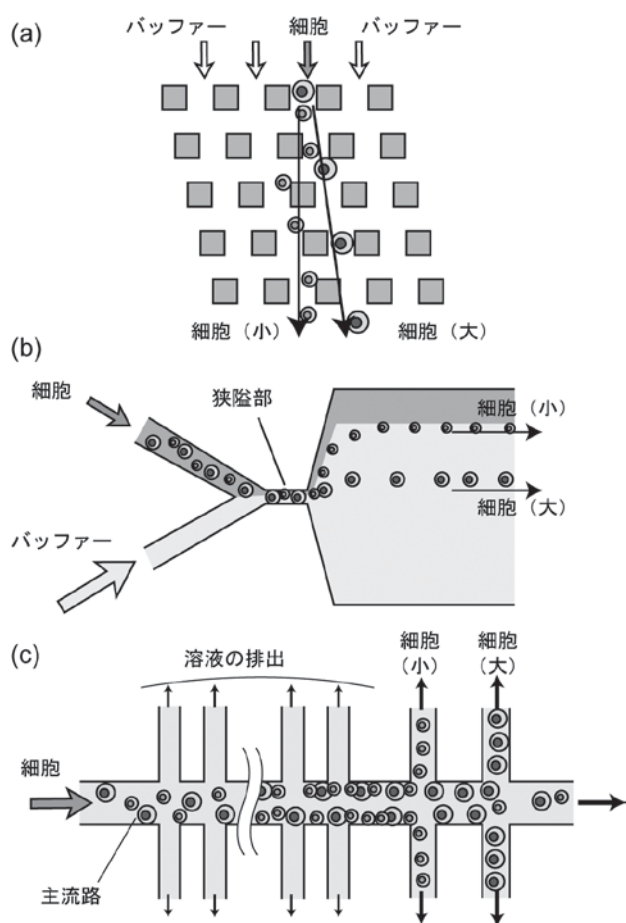


図1. サイズに基づいた細胞分離のためのマイクロ流路の例。(a) ピラー構造を用いた分離手法, (b) 狭隘部を有する流路構造を用いた分離手法, (c) 複数の分岐を有する流路を利用した水力学的フィルトレーション。

を連続的に導入すると、大きな細胞はピラーのずれに沿って横方向に移動する一方で、小さな細胞はピラーの間隙を抜けて流れ方向に従うため、これらの細胞は連続的に分離される、という面白いアイデアに基づいた手法である。なお、ピラーの間隔や配置を調節することによって、分離される細胞のサイズを任意に変更できる。応用として実際に血球細胞などを対象とした分離に効果を発揮することが実証され、大きな注目を集めたと言える⁸⁾。この研究とほぼ同時期に筆者らが開発した手法が、合流部が一部分細くなった流路構造を用いた連続的分離手法である、ピンチド・フロー・フラクショネーション法である(図1b)^{9,10)}。この手法では、細胞懸濁液とバッファーを連続的に導入し、狭隘部においてすべての細胞を片側の側面に配列させ、その後流路幅を拡大することによって、大きな細胞はより中心側を、小さな細胞はより壁面側を通過するため、分離を行うことができる。さらに、その分離手法をある意味直列的に組み合わせることで、分離精度と操作性を向上させた手法が、水力学的フィルトレーションと呼ばれる手法である(図1c)^{11,12)}。この手法では、流路構造を電気回路のような抵抗回路のアナログとみなして流路設計を行うことで、選ばれる細胞のサイズを任意に調節できる。これまでに、肝細胞および非実質細胞の分離¹³⁾や、血液中の赤血球および白血球の高速分離や白血球の分画などを行ってきた。さらに、大きさによって細胞を分離した後に、抗体標識した細胞を磁気泳動によって分離することで、細胞を複数の要因に基づいて同時に分離する手法の開発も行っている¹⁴⁾。またこれらの手法以外にも、細胞の慣性力を利用した分離¹⁵⁾などさまざまな原理に基づく分離法が報告されており、現在でも研究が活発である。これらの手法の多くは、特定の流路構造に細胞懸濁液を連続的に導入するだけで細胞を簡便に分離・選別できるため、幅広い応用可能性が期待される。

表面の性質を利用した細胞の選別

細胞表面に存在するマーカー分子は、その細胞を決定的に特長づける重要な要因であり、FACSやMACSなどにおいて広く用いられている。これらの手法では、蛍光分子あるいは磁気微粒子によって標識された抗体を用い、マーカー分子を発現する細胞を選別するという実験操作が行われている。しかしながら、抗体による標識は細胞の性質や機能に何らかの影響を与えることが否定できず、用途によっては使用が制限される場合も考え得る。そのため、ラベルフリーで分離する手法が好ましいと言え、そのような操作を実現するためのマイクロ流体システムも開発されてきた。

筆者らは、水性二相溶液系を用い、マイクロ流路の中で並行層流を形成することで、細胞の表面状態の差に依

じて細胞を分離する手法の開発を行った(図2a)¹⁶⁾。水性二相系とは、複数種類のポリマーや塩を高濃度で含む水溶液が自発的に二相に分離する系であり、細胞はその表面の性質によって各相への親和性が異なるため、異なる表面状態の細胞を分離することができる。この手法では、抗体を用いた場合と比べて特異性は高くないものの、非標識の細胞を連続的に分離することが可能であった。

また、抗体を用いた手法であっても、流路表面側に抗体のパターンを形成することによって、細胞側は非標識な状態のまま連続的に分離するユニークな手法も提案されている(図2b)^{17,18)}。この手法では、流れ方向に対してある角度をもって形成されたレセプター(抗体など)のパターンを有する流路構造を利用する。流路表面を細胞は回転しながら流れるため、表面マーカー分子の発現が多い細胞は、入口から徐々に横方向にシフトしていき、表面マーカー分子の発現量に依存した細胞の分離が可能となる。さらに Tonerらは、血液1 mLあたり数個程度しか存在しないCTCを分離するための抗EpCAM抗体を標識したピラー構造を開発し、CTCの高効率な分離・回収を実証した¹⁹⁾。表面マーカーを用いた細胞の選抜は、既存の手法が確立されていると思われがちであるが、これらの例のようにごく微量の細胞を効率的に選抜する上

では、微小デバイスを用いた場合には細胞のロスが少なくなるため、分析・診断用途を中心として大きな効果を発揮するものと考えられる。

多様な原理に基づいた細胞分離

以上では、外部からの物理的操作を利用せずに細胞をサイズあるいは表面マーカーによって選抜する装置について紹介したが、これらの他にもさまざまな物理操作を組み合わせることで細胞の選抜を行うシステムも報告されている。たとえばLund大学のLaurellらのグループでは、細胞を連続的にマイクロ流体デバイスに導入しつつ超音波を照射することで、細胞を比重やサイズによって選抜する手法について長年研究している²⁰⁾。また、誘電泳動による幹細胞・始原細胞の選抜や²¹⁾、光圧力を利用した粒子の分離システム²²⁾などユニークな研究例も提案されている。さらに近年、粒子や細胞をその形状によって分離する、という報告例もいくつかなされている。一般的に動物細胞を懸濁状態にすると、その形状は球形に近くなるが、微生物や植物細胞、あるいは動物細胞であっても血球細胞などは、さまざまな形状を有している場合があり、大きさのみならず形状による簡便な分離が実現できれば、新しい応用研究が可能となると考えられる。筆者らのグループでは、前述の水力学的フィルトレーション法を利用して、細胞や粒子の形状がそれらの分離挙動に与える影響を評価した。その結果、分裂途中の白血球細胞のような双子型の形状を有する粒子は、短径あるいは長径が同じ球形の粒子とはまったく異なる回転運動を行っており、それらとは高精度に分離できることが確認された²³⁾。さらに、出芽酵母のような不定形の細胞を分離したところ、形状によって分離が可能であり、たとえば細胞周期の同調といった応用の可能性が確認できた。一般的に形状によって細胞を選抜する場合、形状を目視で個別に認識した上で、マイクロマニピュレーターなどを用いてピックアップする必要があるが、マイクロ流路を利用することで、形状をパラメーターとした自動的な粒子分離が可能であることが確認された。

なおマイクロ流路を用いた実験において、通常はシリンジポンプなどの送液装置を別に用意して利用するケースが多い。しかし高精度なポンプは数十万円程度することが多く、マイクロ流路の実用化を阻む要因の一つとなっていると言える。そのため、大抵の研究室に1台はある遠心機や、あるいは簡単なモーターなどを利用して遠心力を発生させることで送液を行う、Lab-on-a-CDと呼ばれる流路装置の開発も盛んである。遠心力を用いて送液を行うばかりでなく、細胞分離において遠心力を効果的に加えることによって、比重およびサイズによって細胞を分離する手法の開発も行われている^{24,25)}。

マイクロ流路を用いた実験において分離対象となる細

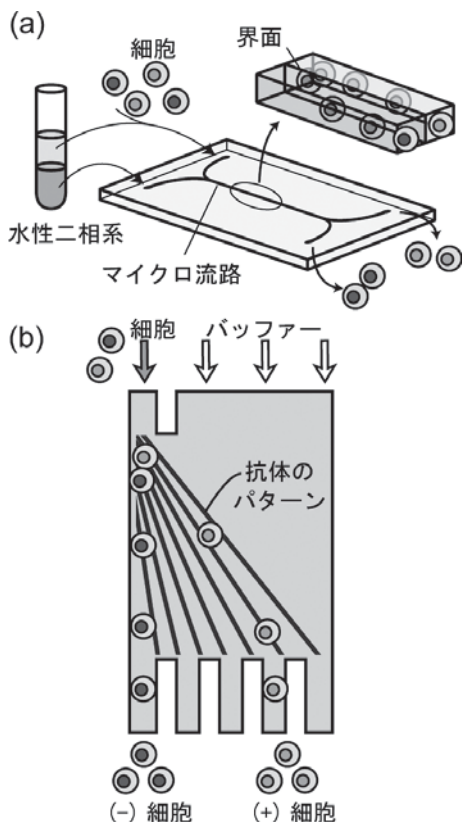


図2. 細胞の表面状態を利用した細胞分離システムの例。(a) 水性二相層流系を利用したマイクロ流路。(b) パターン化レセプター(抗体など)を利用した流路システム。

胞としては、血液分析や診断を目的として、血球が用いられることが多い。血液は標準的なサンプルであるため、個々の流路技術の分離パフォーマンスを客観的に比較する上でも有用である。通常の白血球および赤血球の分離、白血球の分画、血小板の除去、といった分離操作に加えて、診断医療や細胞の機能解析に資する研究も行われている。例として、マラリアに感染した赤血球は、その剛性が高くなり変形しにくくなることが知られているが、直径2 μm 程度の流路構造を通過する際の挙動が、マラリア感染の有無によって異なるという知見が得られた²⁶⁾。また障害物を配置した流路構造を用い、変形能の違いに基づいてマラリアに感染した赤血球を分離する手法も報告されている²⁷⁾。

また、用途によっては処理量の増加が必要となる。通常のマイクロ流路デバイスでは、通常は処理量が数~数100マイクロリットル毎分程度であることが多く、用途によっては不十分である場合もある。そのため、処理量の増加は大きな課題の一つであると言える。流路を並列化することで処理量の向上を図る研究も行われているが、単一の流路であっても処理量を向上させる研究も行われている。たとえば、MITのHanらは、断面が台形であり、らせん型(蚊取り線香型)の流路構造を利用した細胞分離システムの提案を行っている²⁸⁾。比較的大きな流路(幅500 μm 程度)の断面における循環流を利用することで、希釈血液からの白血球及び赤血球の分離において数ミリリットル毎分という処理量を実現した。

今後の展望と実用化に向けた課題

このようにマイクロ流体デバイスを用いた細胞分離は、その分離原理や用途が多岐にわたっており、現在も盛んに研究がなされている。微小な空間の特徴を利用した新しい技術が開発されており、アイデア次第でまだまだ新しい面白い分離法が提案されることであろう。また、異なる原理に基づく分離システムを併用することによっても、より正確な細胞選抜が可能となると考えられる。たとえば幹細胞研究分野においては、細胞の栄養要求性の違いを利用して、培地成分を調節・変更する(グルコースと乳酸を置換する)だけで特定の分化細胞を選抜する手法が報告されている²⁹⁾。このような新規アイデアによる細胞選抜や、既存のFACS・MACSなどの手法と組み合わせを行うことで、目的に応じた高度な細胞選抜が可能となるものと期待できる。

しかしながら、マイクロ流路による細胞選抜技術を実用化・商業化する上で、いくつかの解決すべき課題も存在する。上述したように、(1) 特殊な外部装置やポンプなどが不要となるような操作性の向上、(2) 処理量の向上、という2点は、多様なユーザーによる幅広い用途を想定した場合に不可欠であるが、それらに加えて、

(3) 流路構造の大量作製法の開発、(4) 分離精度のさらなる向上、(5) マイクロ流路を用いることで初めて実現可能となるキラーアプリケーションの開発、といった課題もある。操作性に関して言えば、たとえばシリンジフィルターを使うような感覚で簡便に使用できるシステムが開発されれば、実用化という意味でも大いに有利であろう。また、処理量の向上としては、人工透析に用いられる中空糸カートリッジと同程度の処理量(たとえば血液の場合毎分100~200 mL)が達成されれば、研究開発のみならず疾病治療などの医療応用も可能となると考えられる。さらに、細胞分離に用いられるマイクロ流路構造は通常はシングルユース(使い捨て)であることが望まれるため、細胞と同程度のサイズの流路構造を大量に作製するプロセスの開発も必須である。10年前には思いもよらなかった細胞分離システムが開発されていることを鑑みると、10年後には既存の手法を置き換えるようなシステムや製品が多数実現されているものと期待している。

文 献

- 1) Bhagat, A. A. S. *et al.*: *Med. Biol. Eng. Comput.*, **48**, 999 (2010).
- 2) Gossett, D. R. *et al.*: *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 3249 (2010).
- 3) Autebert, J. *et al.*: *Methods*, **57**, 297 (2012).
- 4) Duffy, D. C. *et al.*: *Anal. Chem.*, **70**, 4974 (1998).
- 5) Umemoto, T. *et al.*: *Stem Cells*, **24**, 68 (2006).
- 6) Tatenno, C. *et al.*: *Hepatology*, **31**, 65 (2000).
- 7) Huang, L. R. *et al.*: *Science*, **304**, 987 (2004).
- 8) Davis, J. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14779 (2006).
- 9) Yamada, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **76**, 5465 (2004).
- 10) Takagi, J. *et al.*: *Lab Chip*, **5**, 778 (2005).
- 11) Yamada, M. and Seki, M.: *Lab Chip*, **5**, 1233 (2005).
- 12) Yamada, M. and Seki, M.: *Anal. Chem.*, **78**, 1357 (2006).
- 13) Yamada, M. *et al.*: *Biomed. Microdevices*, **9**, 637 (2007).
- 14) Mizuno, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **85**, 7666 (2013).
- 15) Hur, S. C. *et al.*: *PLoS One*, **7**, e46550 (2012).
- 16) Yamada, M. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **88**, 489 (2004).
- 17) Karnik, R. *et al.*: *Nano Lett.*, **8**, 1153 (2008).
- 18) Choi, S. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 1427 (2012).
- 19) Nagrath, S. *et al.*: *Nature*, **450**, 1235 (2007).
- 20) Laurell, T. *et al.*: *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 492 (2007).
- 21) Flanagan, L. A. *et al.*: *Stem Cells*, **26**, 656 (2008).
- 22) MacDonald, M. P. *et al.*: *Nature*, **426**, 421–424 (2003).
- 23) Sugaya, S. *et al.*: *Biomicrofluidics*, **5**, 24103 (2011).
- 24) Morijiri, T. *et al.*: *Microfluid. Nanofluidics*, **11**, 105 (2011).
- 25) Morijiri, T. *et al.*: *Microfluid. Nanofluidics*, **14**, 1049 (2013).
- 26) Shelby, J. P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14618 (2003).
- 27) Bow, H. *et al.*: *Lab Chip*, **11**, 1065 (2011).
- 28) Wu, L. *et al.*: *Anal. Chem.*, **84**, 9324 (2012).
- 29) Tohyama, S. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **12**, 127 (2013).