

# 多能性幹細胞を分離回収するマイクロチップに関する研究

電子技術課 高田耕児 横山義之 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

近年、成人の皮膚や骨髄の細胞の中に、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きており、体細胞中に存在する幹細胞の研究がますます盛んになっている。それらの細胞を再生医療に応用する研究を進めるうえで、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。別報 (H24 年度大学連携先端研究「多能性幹細胞を分離回収するマイクロチップの開発」) において、多能性幹細胞を分離回収する際の前処理として、細胞の凝集塊等サイズの大きなものや細胞の残骸等サイズの小さなものを目的の細胞から分離するためのマイクロチップの開発について報告した。本研究ではこのマイクロチップに細胞を流すためのシステムの構築を行い、実際に培養細胞を用いた実験を行った結果を報告する。

## 2. チップシステムの開発

まず、マイクロチップに蓋をして送液チューブ等を接続することのできるチップホルダを作製した (図 1)。マイクロチップには液の入口および出口を二つずつ設け、一方の入口から導入された細胞等がマイクロチップ内で分離されて、二つの出口から分かれて回収される構造とした。次に、シリンジポンプにより送液し、倒立型顕微鏡により細胞の観察を行うことのできるシステムを構築

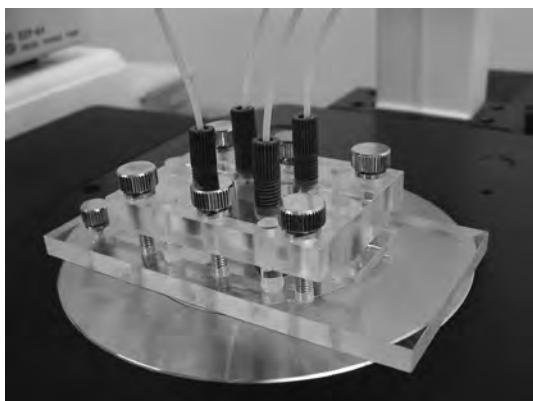


図 1 チップホルダ



図 2 送液・観察システム

した (図 2)。シリンジポンプは 2 系統を二つの出口に接続し、両方から吸引することにより送液することとした。

## 3. 細胞分離実験

培養細胞を用いた送液実験を次のようにして行った。培養細胞は KYSE220 を用い、トリプシン処理により回収した後、フルオレセインにより蛍光標識した。送液バッファは 1% BSA と 2mM EDTA を含んだ PBS を用いた。細胞濃度は  $6 \times 10^5$  cells / mL とした。流速は、 $20 \mu\text{L} / \text{min}$  (シリンジポンプ 1 系統あたり  $10 \mu\text{L} / \text{min}$  で 2 系統) とした。流路を流れる蛍光標識細胞を青色光で励起し、露光時間 2.5 秒で撮影することにより、細胞の軌跡を観測した。

マイクロチップは文献<sup>1)</sup>を参考に微細な柱が並んだ構造をしており、その柱は一系列ごとにシフトしている (図 3)。柱間のギャップ等で決まるしきい値より小さい粒子は、層流に乗って液の流れの方向に対して平行に進む。しきい値より大きい粒子は、柱のシフトとともにシフトしていき、液の流れの方向に対して斜めに進む。

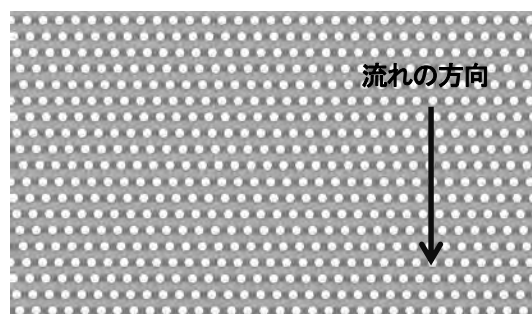


図 3 マイクロピラーの配列 (SEM 像)

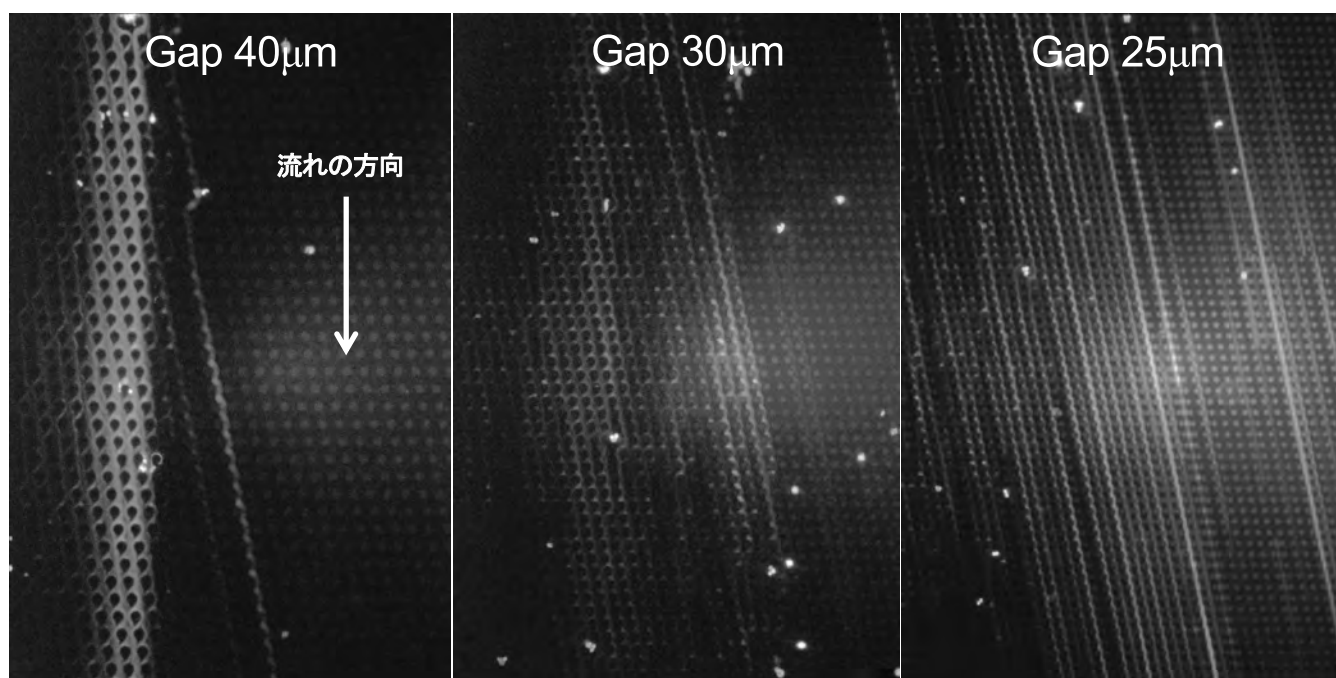


図4 細胞分離実験

細胞分離実験の結果を図4に示す。柱の直径 $40\mu\text{m}$ （柱間のギャップも直径と同じ、以下同様）のチップでは、ほとんどの細胞が層流に乗って液の流れの方向に対して平行に進んだ。これは、細胞が柱間のギャップ等で決まるしきい値より小さいためと考えられる。柱の直径 $30\mu\text{m}$ のチップでは、平行に進む細胞と斜めに進む細胞が同程度観察された。そして、柱の直径 $25\mu\text{m}$ のチップでは、多く細胞が斜めに進んだ。これは、柱間のギャップが小さくなるにつれ、細胞が柱のギャップ等で決まるしきい値より大きくなったためと考えられる。これらのことから、適切なサイズの柱及びギャップを選べば、目的のサイズの細胞の分離が可能であることが示された。

柱のギャップを $20\mu\text{m}$ 以下に小さくしたチップでは多くの細胞が流路に詰まる結果となった。

#### 4. 結言

細胞を分離する樹脂マイクロチップに細胞を流すためのシステムの構築を行い、培養細胞を用いて細胞分離実験を行うことができた。これにより今後はさまざまな細胞へとこのチップシステムを応用していくことが可能となった。

#### 参考文献

- 1) A. Davis J. A. *et al.* PNAS **103**, 14779-14784 (2006)

#### 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富山大学 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

### Study on Polymeric Microfluidic Devices for Stem Cell Separation

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Chika KOIKE, Toshio NIKAIDO (University of Toyama)

Tsuyoshi KOGA (Kyoto University)

Microfluidic chip system which could be used for cell separation and recovery were developed using new UV curable resin and a new molding method. We examined several microchips in which the size and arrangement of micropillars was altered, and carried out cell separation tests. We showed that size-based cell separation could be performed by our polymeric microfluidic device. This device could also be applied to separation of circulating tumor cell, nucleated red blood cell, etc.