

# Feature Article

特集論文

## 哺乳類細胞高速分析用マイクロ流体素子

Christopher T. Culbertson

我々は、マイクロ流体素子上で非接着性の単細胞を培養し分析するための技術を開発している。このマイクロ流体素子を用いると、1個の細胞を数日間かけて20,000個にまで培養することができる。培養細胞は、細胞分裂のたびに娘細胞の一つが遊離し、下流で分析できるように配置されている。遊離した娘細胞はチャンネルマニフォールド内を移動するが、そのチャンネルマニフォールド内で外部刺激を与えて反応させ、その反応の様子を観察する。娘細胞はその後培養され、チップ領域に運ばれ、そこで溶解される。その溶解物は分離され、測定対象のマーカが検出され数値化される。

### はじめに

細胞は、生命の基本的な構成単位である。ほとんどすべての病気は、細胞レベルでの何らかの調節異常が原因で発症する。病気がどのように発症するのか、また、治療法をどのように開発すべきなのかをより良く理解するためには、細胞生理学を完全に理解する必要がある。細胞生理学の知識は、細胞溶解物を集めて分析することによりある程度、得ることができる。しかし、希少な異常細胞から得られる示唆に富んだ分析結果が、細胞溶解物を集めて分析した母集団の中で平均化され、わかりにくくなる場合も少なくない<sup>[1]</sup>。しかも、これらの異常細胞は、病気の初期段階の兆候を示す、非常に重要な細胞である可能性が高い。癌は、この良い例で、異常な細胞分裂を引き起こすだけの数の突然変異が起これば、たった1個の細胞からでも癌が発生しうる。もしこれらの異常細胞を初期に、例えば、毎年の健康診断で見つけることができれば、適切な治療を行い、最善の予後を患者にもたらすことができる。

### 単細胞分析用マイクロ流体素子

単細胞を高速分析できれば、医療診断技術が著しく向上する。しかし、単細胞を高速に処理し、潜在的な病気を示す十から数百項目もの有用なバイオマーカを各細胞か

ら採取し調べることは容易でない。フローサイトメトリなどの従来の技術では、毎秒数千個の細胞を調べることができる。しかし、同時に検出できるマーカの数は一様に10項目以下である。これは、重要なマーカの検出に使われる蛍光のスペクトル帯域幅に制限があることが主な理由である。また、蛍光顕微鏡検査法では、スペクトル帯域幅の制限は同様である上、処理能力は更に低い。そこで、フローサイトメータのより高い処理能力に、多種の細胞マーカを検出する能力を組み合わせることのできる新技術が必要である。そこで、この達成に有望な技術として、マイクロ流体工学(lab-on-a-Chipまたは微小化学物質分析システム( $\mu$ TAS))が挙げられる。マイクロ流体素子は、小さなチャンネルからなるマニフォールドから構成されている。このマニフォールドのチャンネルの末端に圧力または電圧をかけることにより、そのチャンネルの中を通る細胞や試薬を任意に動かすことが可能である。一般的に、このチャンネルの幅及び深さはそれぞれ1~100ミクロンであるが、非接着性の哺乳類細胞を移動させ処理するために我々が作ったチャンネルの深さは、多くの場合15~20  $\mu$ mである。単一基板上に、接続したチャンネル間にデッドボリュームがなく、複雑なチャンネルマニフォールドを作ることができれば、大幅な希釈や帯域拡張をしなくてもいろいろな化学的操作を行うことができる。また、0.5 pL以下の細胞を、その溶解物を大幅に希釈することなしに、個々に分離チャンネルに注入することもできる。更に、表面

積対体積率が大きいので、高い電場が利用可能になり、複雑な試料でも高速かつ高能率に分離できる。そのような高性能の分離ができ、また、その後の細胞処理と溶解処理に直接つなげられることがマイクロ流体素子の特に単細胞分析で有効な理由である<sup>[2]-[4]</sup>。

我々は、過去数年間に渡って、マイクロ流体素子上で細胞を運ぶ方法、細胞にレポーター分子を取り付ける方法、細胞を培養する方法、細胞を高速溶解する方法、及び、ラベリングした溶解成分を分離する方法を開発してきた。この研究は、Dr. J. Michael Ramsey (University of north Carolina at Chapel Hill, NC)とDr. Nancy L. Allbritton (University of north Carolina at Chapel Hill, NC)と我々との共同で行われ、National Institutes of Healthにより支援されてきた。

我々の最初の仕事<sup>[5]</sup>は、まず、単細胞溶解物の高速分析用にマイクロ流体素子が持つ潜在能力を示すことであった。我々は、交差している点を通過して細胞を流体力学的に運ばせ、33 ms (ビデオレートで撮影できるカメラの1フレームの時間)以内に細胞を溶解させることができた。この溶解物は、次に、細胞を溶解するために使われた電場と同じ電場を用いて分離チャンネルに注入された。これらの細胞には、2種の蛍光色素(オレゴングリーン・カルボン酸ジアセテート(Oregon green carboxylic acid diacetate)とカルボキシフルオセイン・ジアセテート(Carboxyfluorescein diacetate))のラベルが付けられた。この色素はどちらも電氣的に中性のため細胞膜を通過し、細胞を染色することができる。一旦細胞内に入ると、細胞内のエステラーゼが色素のアセトキシ基を分解し、これにより帯電した色素が蛍光を発する<sup>[6]</sup>。オレゴングリーンは、複雑な代謝を経て、再現性のある5つのピークを生じさせた。我々はこれら5つのピークそれぞれを、また、これら5つのピークと加水分解されたカルボキシフルオセインの蛍光とを、注入の交点からわずか3 mm入った地点で注入後2.2秒以内に分離することに成功した。

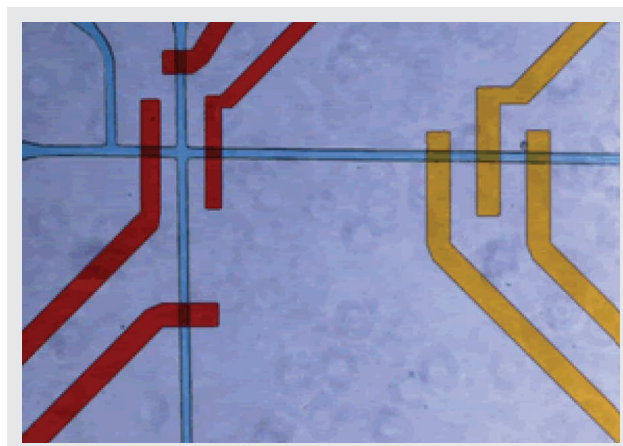


図1 細胞処理用マイクロ流体素子の光学顕微鏡写真

この実験には成功したもの、ガラスチップ上で再現性のある注入を行うことは難しかった。そこで、Kansas州立大学の我々のグループは、ガラスチップ内の細胞輸送速度の設定や、交点での細胞の位置決めが大幅にしやすいようなチップ設計に着手することにした。この設計を実装するために、ポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane: PDMS)の使用を検討する必要があり、また、Stanford大学のSteve Quakeの研究室で独自に開発されたソフトレイヤー多重リソグラフィ技術を使う必要があった<sup>[7,8]</sup>。図1に、流体の流れと細胞輸送を制御するため、交点の周りにペリスタポンプとバルブ類を設置した設計を示す。この素子には、PDMSの薄膜で分離された2枚のチャンネル層がある。1番目の層には流体を満たしたチャンネルがあり、このチャンネルで細胞を運び分離する。2番目の層は、空気だけが入った一連の制御チャンネルからなる。約1気圧の空気がこの制御チャンネルに加えられると、制御チャンネルと流体チャンネルの間の薄膜が伸びて流体チャンネルの中に入り込み、チャンネルを閉じさせる。黄色の3個のバルブは順次閉じて、ペリスタポンプの働きをする。赤い4個のバルブは、流体チャンネル交点で細胞を捕捉し、縦の青い流体チャンネルに沿った電位を利用してその細胞を溶解させるのに使われる。

図2(a)は、Tリンパ球細胞が捕捉された素子の、イメージ



図2 細胞の捕捉と溶解、それに続く溶解物の分離チャンネルへの迅速注入

図である。細胞は、水平の流体チャンネル上部に位置するバルブを作動させることにより捕捉される。細胞の検出は、細胞の蛍光発光を検出することにより自動的に行われる。レーザーの焦点は、垂直の流体チャンネルの左側に合わせてある。細胞はレーザーを通過する時に蛍光を発生し、チャンネルの交点に焦点を合わせてある顕微鏡に取り付けたPMTで検出される(図3)。これにより、バルブが作動する。またこれにより、図2に示すように、細胞溶解と溶解物分離の連鎖が開始される。

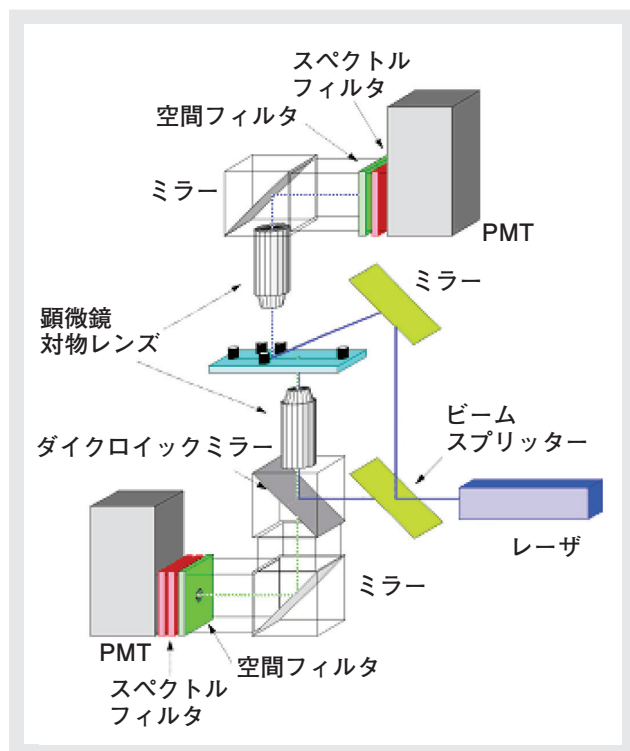


図3 二重検出システムの概略図  
1つのレーザービームと検出器が処理前の細胞を溶解直前に検出するのに使われ、2番目のビームと検出器は溶解物を検出するのに使われる。

一旦細胞が溶解すると、溶解物の成分のうちラベルを付けた分子が、動電学的に分離チャンネル内に注入される。2番目のレーザーの焦点はそのチャンネルの注入点から約5 mm下流に合わせられている。標識分子はこのビームを通過する時、励起され蛍光発光する。この蛍光が、顕微鏡の対物レンズで集光され、PMTで検出される。図4に、カルセインAMとオレゴングリーン488色素の、2秒間で検出された分離結果を示す。

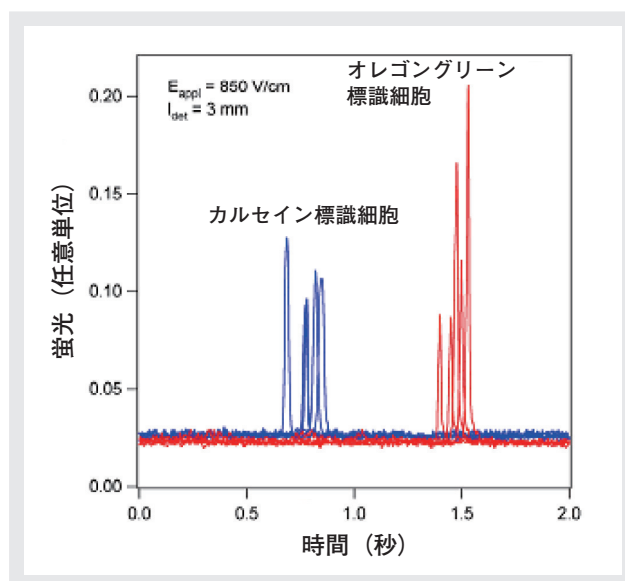


図4 カルセイン標識細胞とオレゴングリーン標識細胞の蛍光測定結果  
10個のジャークット細胞からカルセインとオレゴングリーンが検出された。カルセイン標識、オレゴングリーン標識細胞がそれぞれ5個ずつ。

## マイクロ流体素子上での細胞培養

我々は論文<sup>[5]</sup>で、オレゴングリーン加水分解物の分離パターンが、大きく異なっている細胞が存在することも述べた。この理由の一つとして、我々が実験に用いた細胞株(ジャークット細胞)が不死化されていたために、観察された細胞が異なる細胞周期にあったと考えられる。細胞検査対象となる人体細胞の多くが成人期以後のものであるため、最終的な目標は細胞検査の大部分を占める、G0/G1期の細胞を調べることである。従って、この素子の有効性を適切に立証するためには、細胞周期を同調させることが求められる。加えて、この素子をさまざまな症状に効果のある薬剤をスクリーニングする目的で使う場合には、細胞周期を同調した、特徴のよく現れた細胞集団が必要となる。従って、我々は、細胞を溶解させる流路交点の上流の位置に、細胞培養システムを組み込むことに着手した。この細胞培養機能素子を図5に示す。この素子は8個の並列チャンネルから構成されている。各チャンネルには2500個の細胞ウェルがあり、各ウェルの直径は15  $\mu\text{m}$ で、各ウェルは平均1個の細胞を保持する。ウェルの深さを15  $\mu\text{m}$ としたのは、細胞分裂が起きると娘細胞の一つがウェルの外に押し出されるという動作を狙ったためである。そして、その押し出された細胞はウェル上の流体の流れに取り込まれ、溶解地点となる流路の交点へ迅速に運ばれる。配列を満たす数の細胞の増殖に24時間かかり、その分裂は非同調であると仮定した場合、約4.3秒ごとに



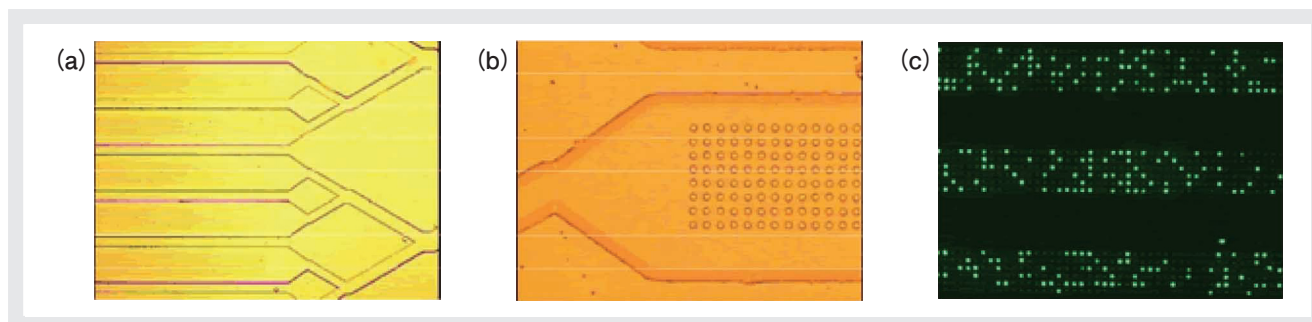


図5 マイクロ流体素子上での単細胞配列  
 (a)細胞のウェルを含む8個のチャネル中の5個のチャネルのイメージ  
 (b)1個のチャネルの拡大図  
 (c)カルセイン標識Tリンパ球(ジャーカット細胞株)で満たされたウェルの蛍光イメージ

1個新しい細胞が細胞配列から放出され分析される。このようにして我々は、素子上で、48時間では90%以下、10日間では40%の細胞生存率で細胞を培養することを可能とした。

## おわりに

我々は、個々の非接着性哺乳類細胞の細胞内物質を高速分析するため、マイクロ流体素子に組み合わせる細胞処理部品の開発を行ってきた。この素子の微細チャネルを使えば、チップ全体にわたり細胞の正確な輸送が可能になり、大幅な希釈なしに細胞溶解物を注入することができる。更に、細胞溶解と細胞培養を統合させた機能を用いて、細胞の状態をより基本的生理的に制御することによって、実験結果の安定性や情報内容を改良することができるだろう。近い将来、我々は、酵素活性や、キナーゼなど興味深い酵素に対する作用薬・拮抗薬の蛍光レポーターを標識した細胞を分析できるように、処理能力を追加することを計画している。

## 参考文献

- [1] Martin, R. S.; Root, P. D.; Spence, D. M. *Analyst* (Cambridge, United Kingdom) 2006, 131, 1197-1206.
- [2] Price, A. K.; Culbertson, C. T. *Analytical Chemistry* (Washington, DC, United States) 2007, 79, 2614-2621.
- [3] Roman, G. T.; Chen, Y.; Viberg, P.; Culbertson, A. H.; Culbertson, C. T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387, 9-12.
- [4] Sims, C. E.; Allbritton, N. L. *Lab on a Chip* 2007, 7, 423-440.
- [5] McClain, M. A.; Culbertson, C. T.; Jacobson, S. C.; Allbritton, N. L.; Sims, C. E.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5646-5655.
- [6] Haugland, R. P. *The Handbook: A guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th ed.; Invitrogen: USA, 2005.
- [7] Fu, A. Y.; Chou, H.-P.; Spence, C.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. *Anal. Chem.* 2002, 74, 2451-2457.
- [8] Unger, M. A.; Chou, H.-P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S. R. *Science* 2000, 288, 113-116.



**Christopher T. Culbertson**  
 Kansas State University