

新製品紹介

生細胞のダメージレスソーティングシステム

Damage-Less Sorting System for Live Cells

古河電気工業(株)

1. はじめに

生細胞、特にhES細胞(human embryonic stem cells)・幹細胞(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などの実現に極めて重要です。この希少な細胞を良質な状態で取得するシステムの完成は、熾烈な競争が繰り広げられている世界中の医薬関係の研究者に切望されています。当社では、光通信分野で培った光技術やメカトロニクスなどの固有技術を活用し、世界初の生細胞ダメージレスソーティングを特長としたフローサイトメータ(セルソータ)を開発、商品化したので紹介します。

2. 特長

2.1 光ファイバ式フローサイトメータ

フローサイトメータは、フローセル内に溶液に分散させた細胞を個別に流し、励起光を照射して散乱光及び蛍光情報を取得することで、細胞の同定や細胞群を構成する種々の細胞の存在比率を短時間で解析する装置です。このフローセルにレーザ照射用及び蛍光、散乱光などの受光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光ファイバ式フローサイトメータを開発致しました。図1に光学系構造を示します。従来の空間結合による光学レンズ系の構成と異なり、励起光照射と受光機能を担う光ファイバの端面が、フローセルの内壁の一部として設けられている構造が大きな特長で、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、光ファイバが精度良く固定されているため従来必要であった光軸調整の作業が不要となっています。図2は、8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、蛍光計測感度は200 MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome) 以下と十分な感度を有しています。

また、計測対象である細胞と受光ファイバ端面の距離は百 μm 程度と非常に近傍で受光することで、従来の前方散乱光の代わりに透過光(細胞の投影面積に対応する情報)という新しい計測情報を取得することを可能としています。図3に大きさの異なるビーズを計測した結果を示します。透過光計測値とビーズサイズには強い相関があり、サンプルの大きさの認識精度が格段に向上しています。この透過光情報が今後の細胞解析に新たな情報を提供することを期待しており、アプリケーションの開発を進めています。

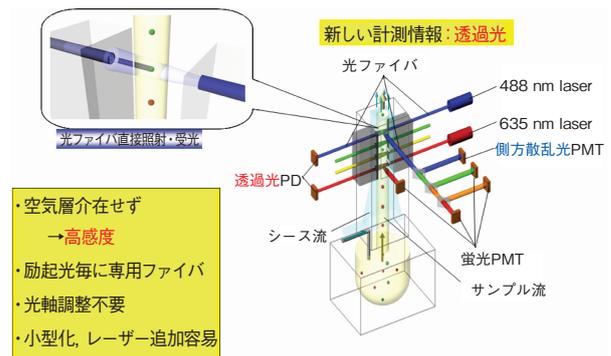


図1 光ファイバ式フローサイトメータの光学系構造
Structure of flow cytometer using optical fiber.

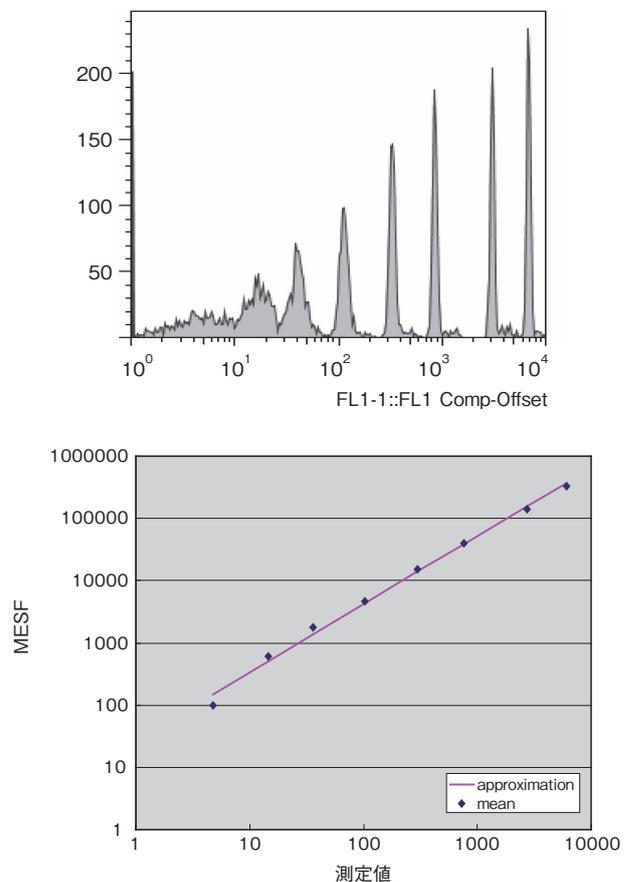


図2 蛍光感度の計測結果
Measurement results of fluorescence sensitivity.

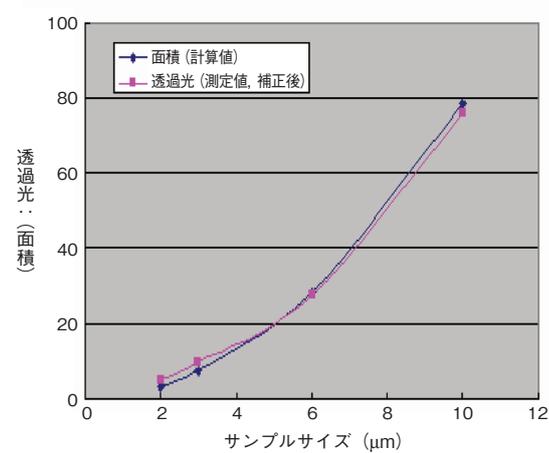
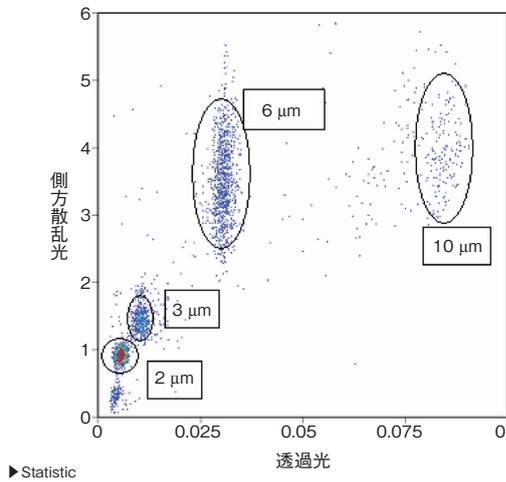


図3 透過光情報の評価結果
Evaluation results of transmission light information.

2.2 ダメージレスソーティング

フローサイトメータは、細胞の解析機能以外に目的細胞のソーティング機能があり、従来のソーティング方法では、高い水圧と超音波により液滴を形成し高電荷を付加してソーティングするプロセスが生細胞にダメージないしは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ES細胞と幹細胞のソーティングには、適さない場合があります。

当社のフローサイトメータでは、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新しいソーティング方法を導入しています。当社のフローセルは、複数の光ファイバが流路に沿って高精度にアレイ状に配置されているので、サンプルの流速を高精度に計測することが可能です。図4に示すように、この流速情報を元に目的細胞がソーティングノズル先端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培養プレートの所定のウェルに移動し、目的細胞をソーティングします。この方法では、細胞にダメージやストレスを与える要因となる超音波と高電荷を全く付加しないため、細胞にとっては限りなく優しい(ダメージレス)ソーティングを実現しています。また、このソーティング方法では、任意のウェルに単一の細胞をソーティングできることから、特に再生医療に必要とされるES細胞と幹細胞の研究に大きく寄与できることを期待しています。

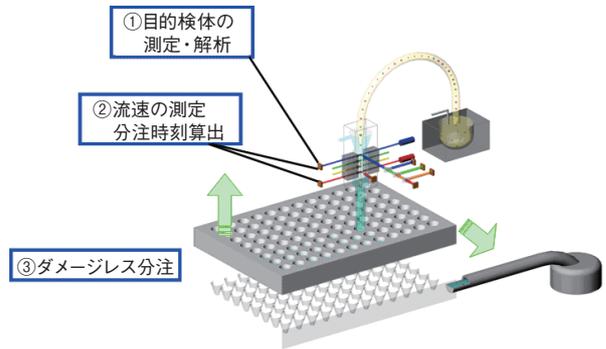


図4 ダメージレスソーティング原理概念図
Schematic of damage-less sorting system.

3. 評価例

図5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、抗体CD4 (FITC染色)とCD8 (PE染色)によるリンパ球サブセット計測の結果です。各抗体によるサブセットが確認できます。

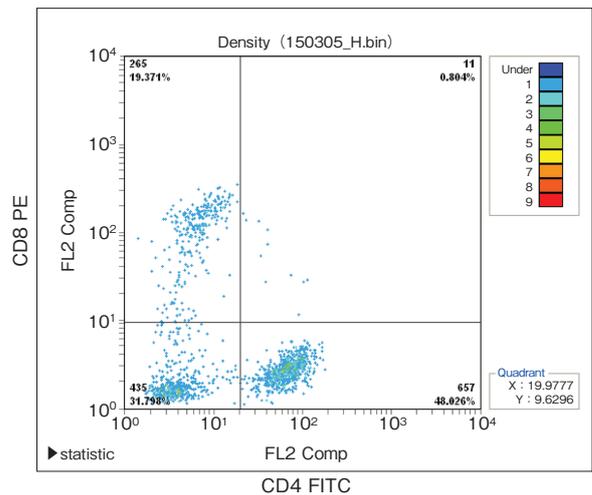
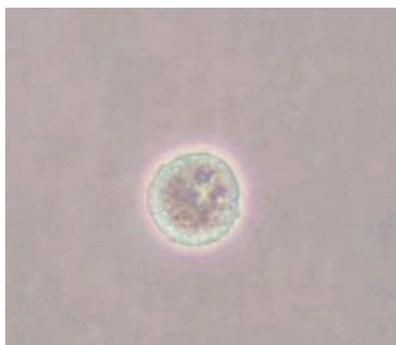


図5 ヒト末梢血リンパ球サブセットの計測結果
Measurement result of subset of human peripheral blood mononuclear cells.

図6は、従来のセルソータで全く扱えなかった最もデリケートな生細胞の1つといわれる巨核球(血小板を作る細胞の一種、φ 150 μm程度)をソーティングした結果です。三日後にその巨核球が生存している状態が確認されています。

図7は、再生医療の研究に必要とされる神経冠幹細胞を見つけるために、マウスの受精卵に緑の蛍光蛋白質を発現できる遺伝子プロモータ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ウェルプレートの各ウェルに単一細胞をソーティングし、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ます。この結果からも、デリケートな脳神経細胞にダメージを与えることなくソーティングできることが確認されています。



Sorting直後



3日 culture

図6 巨核球のソーティング結果
Sorted megakaryocyte.



PERFLOW Ana.



PERFLOW Sort.

図8 PERFLOW Ana 及び Sort の外観
Appearance of PERFLOW Ana and PERFLOW Sort.

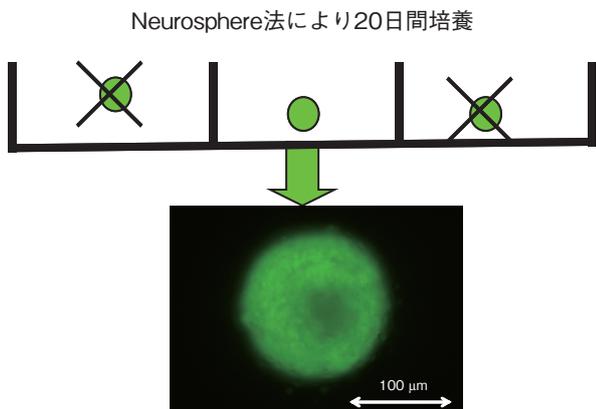


図7 ソーティングされた単一脳神経細胞からのコロニー
Colony prepared from sorted mono-cranial nerve cell.

表1 PERFLOW Ana 及び Sort の主な製品仕様
Specifications of PERFLOW Ana and PERFLOW Sort.

型式	PERFLOW Ana	PERFLOW Sort
搭載レーザー	青:488 nm 半導体レーザー 赤:635 nm 半導体レーザー	
測定パラメータ	透過光(前方散乱光相当)、側方散乱光、蛍光四色(FITC、PI(PE)、PeCy5、APC)	
検出感度	FITC < 200 MESF (Spherotech Rainbow Beads 使用時)	
蛍光検出分解能	CV値(変動係数)4%以下(BD QC Particles 使用時)	
散乱光検出感度	φ2 μm ビーズが検出可能	
サンプル解析速度	20,000 イベント/秒	
光軸調整	不要	
ソート方式		メカニカルフロー切替
サンプル分取速度		1個/秒
サンプル分取機能		6 ~ 384 マルチウェルプレート対応
ソフトウェア	専用制御・解析ソフト標準搭載(FCS対応)	
電源	100 V AC, 50/60 Hz, 4 A	100 V AC, 50/60 Hz, 9 A
サイズ	400 × 550 × 450 mm (WDH)	550 × 600 × 600 mm (WDH)
重量	約40 kg	約90 kg

4. 製品仕様

図8に当社製品2機種の外観を、表1に主な製品仕様を示します。PERFLOW® Anaは解析機能のみで二波長のレーザーを搭載し、4色の蛍光と透過光及び側方散乱光が計測できます。PERFLOW Sortは解析機能はAnaと同等で、任意のウェルに単一細胞をダメージレスでソーティングできる機能を搭載しています。両機種とも独自の光ファイバ式光学系の採用により、極めてコンパクト化を実現しています。更に、ファイバアレイは、最大8本まで拡張可能で、UVレーザーなどの追加もオプションで対応可能です。

また、PERFLOWの名前は、高価なイメージを持たれた従

来のフローサイトメータに対して、各研究室で購入いただけるコストパフォーマンスを目指してパーソナルフローサイトメータの意味を込め命名しました。今後、透過光やダメージレスソーティングなどの特長を有する当社の装置がES細胞や幹細胞などの最先端のライフサイエンスの研究や再生医療の発展に寄与できることを期待しています。

<製品問合せ先>

古河電気工業(株)

生産技術部 第一生産技術開発センター

TEL: 0436-42-1636 FAX: 0436-42-9334