

## マイクロ流体チップを用いた細胞の分離

### 1 はじめに

細胞は生物を構成する最小単位であり、生命科学分野や医学分野における主要な研究対象の一つである。近年の研究により、細胞は個性を持ち、各細胞が異なる挙動や機能を持つことが明らかになっており、がんの発生機序や薬剤の効果にも影響していることが示唆されている。したがって、細胞の個別の分離や分析はきわめて重要な技術として注目されている。

従来、細胞の分離は蛍光活性化細胞選別 (fluorescence activated cell sorting, FACS) や磁気活性化細胞選別 (magnetically activated cell sorting, MACS)、遠心分離等が用いられてきたが、ラベリングが必要なことや、大量のサンプルが必要になることなどから、単一細胞解析には必ずしも適していなかった。

一方で、掌サイズの基板上に半導体加工技術で微細流路を加工したマイクロ流体チップは細胞のスケール適合した流路を作ることが可能であり、単一細胞解析にきわめて適したツールである。その前処理にあたる選別操作も流路やマイクロ構造物を用いることできわめて正確に行うことができる。その手法は大別して一個ずつの細胞を自在に操作する「精密分離」法と大量の細胞を高速に分離する「大量分離」法に分けられる。さらに、「大量分離」法は外部から力を加えることによる「能動式」選別とチップ内部の流体の性質や構造体によって分ける「受動式」選別に分類される。各方式を図1にまとめ、以下の項にて具体的な手法について解説する。

### 2 精密分離法

#### 2.1 超音波による分離

精密分離はすべて能動式分離であり、細胞に直接力を与えて操作・分離するものである。超音波分離は、圧電 (ピエゾ) 素子を用いた音響波により発生する音響圧を利用し細胞を操作するものである。移動距離は細胞サイズ・密度と圧縮性に依存し、マイクロ流路内に腹と節を作り出すことで細胞を節に集約する<sup>1)~3)</sup>。細胞へのダメージが少なく、デバイスの表面のみを振動させる表面弾性波を用いた方法では設備も比較的小型で済むという特徴があり、細胞分離に幅広く用いられているが、操作性や精密性では他の手法に比べやや劣る。

#### 2.2 誘電泳動による分離

誘電泳動とは、細胞が不均一な電界にさらされたときに力がかかる現象である。誘電率の差を利用して細胞を分離することができる。安定的に力を及ぼすためには細胞を液滴に閉じ込めた上で分離する手法がとられる<sup>4)</sup>。これにより、200 cells/s のスループットが達成されている。流路構造に分離を補助する分離帯を導入することでさらにスループットを上げた例もある<sup>5)</sup>。電磁誘導は細胞の侵襲性が少なく操作性も高いという特徴があるが、電解質溶液が必要で液滴を用いるため使える細胞種が限られ、スループットを上げると熱が発生して細胞へのダメージがあり得るといった欠点もある。

#### 2.3 光による分離

光による分離は光で細胞を移動させたり軌道を変えたりするものである。光の焦点サイズや力の大きさは細胞のサイズとマッチし、細胞への侵襲性も比較的低い。このような特徴を活かし、光ピンセットを用いて細胞を選別した例<sup>6)</sup>やレーザーにより 230000 cells/s の高速で FACS 中で細胞を選別した例もある<sup>7)</sup>。このように高速選別にも適したシステムだが、レーザー等の焦点が細胞に合わせられるようシースフローや複雑な流路形状を併せて用いる必要があり、光照射機自体の大きさもあり、システムが大掛かりになりがちである。

#### 2.4 機械的手法による分離

主に圧電 (ピエゾ) 素子を利用し、流路中の流れを変えることで細胞を選別する手法である。高速性と精密操作を両立したシステムが可能であり、HeLa 細胞のような体細胞の選別<sup>8)</sup>の他、ユーグレナのような藻類細胞の選別を 23000 cells/s の高速で行った例もある<sup>9)</sup>。システ

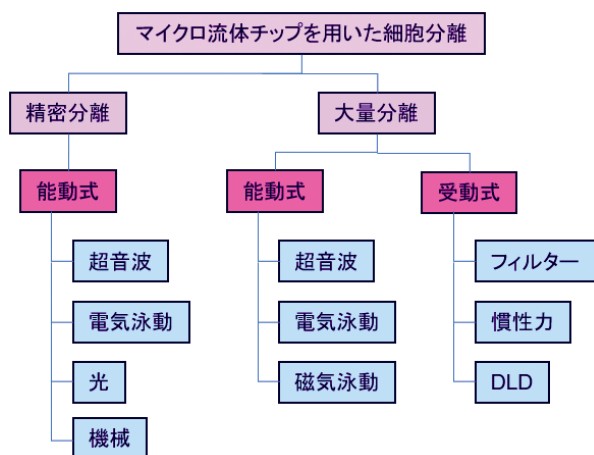


図1 粒子・細胞分離法の分類

ムを並列で24個並べるなどハイスループット化も可能である<sup>10)</sup>が、高電圧や高圧力が必要なこともあり、細胞にダメージがある場合もある。

### 3 能動的な大量分離法

#### 3.1 超音波による分離

大量分離法では精密分離のように一細胞ずつの操作は難しいが、大量のサンプルを短時間に処理して特定の細胞群を抽出することが可能である。精密分離の前処理としても用いられる。超音波を用いた方法では精密分離とは異なり長距離で持続的に超音波振動を与える構造としており、5  $\mu\text{L}/\text{min}$  の高速で血液から単核細胞を選別した例<sup>3)</sup>や循環がん細胞を1000 cell/s以上で抽出した例<sup>11)</sup>などが報告されている。

#### 3.2 誘電泳動による分離

誘電泳動を用いた大量分離方法として精密分離とは異なり細胞自体の誘電率の違いを利用し、流路内で長距離で持続的に電界をかけることで幹細胞と分化後の細胞の選別をラベルフリーで行った例が報告されている<sup>12)</sup>。

#### 3.3 磁気泳動による分離

ターゲット細胞に磁気標識して永久磁石で磁力を加えて選別するものであり、上記MACSをマイクロ流路内に応用したものである。マラリア感染赤血球細胞<sup>13)</sup>や大腸菌細胞<sup>14)</sup>の選別など様々な用途に用いられる。

### 4 受動的な大量分離法

#### 4.1 フィルタリングによる分離

最も基本的な受動的な分離法であり、流路中にダム、ピラーなど様々な構造物やポア膜を配置することで特定のサイズの細胞のみを選別するものであり、ややサンプルロスは大きいですが、血中がん細胞が他の細胞とサイズが異なることを利用した分離などシンプルに細胞分離したいときに有用である<sup>15)</sup>。

#### 4.2 慣性力による分離

細胞の流体中での慣性力による動き、すなわち流路をスパイラル形にしたり、ダムなどを利用して広狭を繰り返したりすることで細胞が一定のエリアに集約することを利用したものである<sup>16)</sup>。高速で流す必要があるが、細胞の希釈やラベリングも必要ないので細胞ダメージやロスも少ない手法である。

#### 4.3 決定論的横置換法 (DLD) による分離

決定論的横置換法 (deterministic lateral displacement, DLD) とは微小なピラーアレイに細胞を流すと、大きい細胞はピラー周囲に生じる流れの変化で斜めに流れ、

小さい細胞は直線的に進む性質を利用して細胞を分離する方法である。様々なサイズの細胞が混じった血液の分離などに有効である<sup>17)</sup>が、精密に分離しようと思えば流路がやや長くなってしまふという課題もある。

### 5 おわりに

細胞分離法の発展は非常に目覚ましいものがあり、ここに挙げた以外にも、気泡を用いたもの<sup>18)</sup>や温度差を用いたもの<sup>19)</sup>などの、新たな原理による分離手法も最近報告されている。いずれの手法も長所と短所があり、用途によって使い分けが必要となる。今後のさらなる技術の発展とそれを活かした生物・医療分野等への展開が期待される。

### 文 献

- 1) Z. Wang, J. Zhe : *Lab Chip*, **11**, 1280 (2011).
- 2) M. A. Faridi : H. Ramachandriaiah, I. Iranmanesh, D. Grishenkov, M. Wiklund, A. Russom : *Biomed. Microdevices*, **19**, 23 (2017).
- 3) A. Urbansky, P. Ohlsson, A. Lenshof, F. Garofalo, S. Scheduling, T. Laurell : *Sci. Rep.*, **7**, 17161 (2017).
- 4) L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, J. A. Heyman : *Nat. Protoc.*, **8**, 870 (2013).
- 5) A. Sciambi, A. R. Abate : *Lab Chip*, **15**, 47 (2015).
- 6) X. Qi, D. Carberry, C. Cai, S. Hu, Z. Yuan, Y. Uan, H. Dunlop, J. Guo : *Biomed. Opt. Express*, **8**, 177 (2017).
- 7) Y. Chen, T.-H. Wu, Y.-C. Kung, M. A. Teitell, P.-Y. Chiou : *Analyst*, **138**, 7308 (2013).
- 8) Z. Cheng, X. Wu, J. Cheng, P. Liu : *Microfluid. Nanofluidics*, **21**, 9 (2017).
- 9) S. Sakuma, Y. Kasai, T. Hayakawa, F. Arai : *Lab Chip*, **17**, 2760 (2017).
- 10) R. Hulspas, L. Villa-Komaroff, E. Koksall, K. Etienne, P. Rogers, M. Tuttle, O. Korsgren, J. C. Sharpe, D. Berglund : *Cytotherapy*, **16**, 1384 (2014).
- 11) P. Li, Z. Mao, Z. Peng, L. Zhou, Y. Chen, P.-H. Huang, C. I. Truica, J. J. Drabick, W. S. El-Deiry, M. Dao, S. Suresh, T. J. Huang : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, 4970 (2015).
- 12) H. Song, J. M. Rosano, Y. Wang, C. J. Garson, B. Prabhakarpandian, K. Pant, G. J. Klarmann, A. Perantoni, L. M. Alvarez, E. Lai : *Lab Chip*, **15**, 1320 (2015).
- 13) A. Blue Martin, W. T. Wu, M. V. Kameneva, J. F. Antaki : *Biomed. Eng.*, **45**, 2888 (2017).
- 14) V. Kumar, P. Rezai : *Biomed. Microdevices*, **19**, 39 (2017).
- 15) C. B. Raub, C. Lee, E. Kartalov : *Sens. Actuators B. Chem.*, **210**, 120 (2015).
- 16) D. Di Carlo : *Lab Chip*, **9**, 3038 (2009).
- 17) H. W. Hou, C. Petchakup, H. M. Tay, Z. Y. Tam, R. Dalan, D. E. K. Chew, K. H. H. Li, B. O. Boehm : *Sci. Rep.*, **6**, 29410 (2016).
- 18) J. Zhao, Z. You : *Cytom. Part A*, **93**, 222 (2018).
- 19) Y. Shen, Y. Yuan, T. Tang, N. Ota, N. Tanaka, Y. Hosokawa, Y. Yalikul, Y. Tanaka : *Sens. Actuators B-Chem.*, **358**, 131511 (2022).

[理化学研究所生命機能科学研究センター  
集積バイオデバイス研究チーム (執筆当時) 田中 陽]