研究論文

像走査法による細胞の分級技術に関する研究*

河村喜雄** 小比田啓之*** 田中伸司† 内田憲孝††

Study of Classification Technique of Biological Cell Using Image Scanning

Yoshio KAWAMURA, Hiroyuki KOHIDA, Shinji TANAKA and Kenko UCHIDA

Increasing the efficiency of hybrid generation of biological cell using a fusion apparatus requires a large number of viable protoplasts, which are classified beforehand from suspension-included viable and disintegrated biological cells. A cytometric classifier has been developed for protoplasts whose diameters are more than about ten micrometers. This paper introduces a new classification method. Protoplasts are supplied through a sheath flow in a flow cell and their images are focused on four slits arranged at different angles to streamline and scan the moving images relatively. Through these slits, three direction length of a protoplast are measured and the protoplast is classified. The classified protoplasts are sorted into microchambers in isotonic solution. Cytometric resolution of the present classifier is $\pm 10 \mu\text{m}$. From the experimental result, knowledge is obtained on the improvement of cytometric resolution and classifying efficiency.

Key words: biological cell, protoplast, cell fusion, cytometry, classification, flow cell, image scanning, slit scanning, microchamber

1. 緒 言

食品や医薬の分野で有用な新品種の植物を育種する方法の一つに細胞融合がある。細胞融合による育種では、目的とする組合せの雑種細胞を 10^4 個以上集めて培養し、その中から植物体を再生し、新しい形質を持ったものを選び出す必要がある。筆者らは半導体の微細加工技術を応用して、大量の細胞を一つ一つ扱うための約 1600 の微細な容器（マイクロチャンバ）を作り、これを用いた新しいコンセプトの 1 対 1 細胞融合装置を開発した¹⁾。既報では、この装置で期待できる雑種細胞の生成率²⁾³⁾や細胞の耐久性を短時間で定量化する方法について述べた⁴⁾。

細胞融合に用いるプロトプラストは、植物の葉肉細胞を酵素処理して細胞壁を溶解除去し、遠心分離等の工程を経て単離精製される（以下プロトプラストを細胞と呼ぶ）。単離された細胞は厚さ 10 nm 程度の細胞

膜に包まれた粒子であり、活性のある細胞は等張液中で浸透圧を保って球形をなす。しかし、精製後の細胞の懸濁液中には、依然として細胞の破片など、大きさが十数 μm 以上の不要な粒子が全細胞数の 20% 程度混在している。これらの不要な粒子は 1 対 1 のペア細胞を作る際の効率低下の要因となる。また、電気的細胞融合に必要な電界強度は細胞の外径寸法に逆比例する⁵⁾。従って、活性のある細胞をその外径によって分級できれば細胞融合による雑種細胞の生成率を向上できる。

直径数 μm 以下の細胞を分級する方法としてフローサイトメータが開発されている⁶⁾。フローセル内の細胞にレーザー光を照射し、細胞からの散乱蛍光を検出して分級するものである。フローセルの出口で流束を液滴化し帯電させ、電界中でその進路を変えて目的の細胞を捕集する方法を用いており、高速処理ができる特徴がある⁷⁾。しかし、染色や液滴化後の細胞の破損などの弊害が指摘されている⁸⁾。

筆者らは、直径 10 μm 以上の細胞を対象とし、染色を必要とせず、さらに破損の少ない分級方法を考案した。具体的には、フローセル中を流れる細胞を光学的に拡大して大きさと形状を判別し、その像が円形の時に球形をなす活性の高い細胞であると判断し、等張液中で容器に分級する方法である。本報告では分級方

* 原稿受付 平成 4 年 2 月 25 日

** 正 会 員 (株)日立製作所中央研究所 (国分寺市東恋ヶ窪 1-280)

*** (株)日立製作所自動車機器事業部 (東京都千代田区丸の内 1-5-1)

† (株)日立製作所機械研究所 (土浦市神立町 502)

†† (株)日立製作所基礎研究所 (埼玉県比企郡鳩山町赤沼 2520)

Fig. 1 Method of measuring biological cell image by slit scanning

法の実験的検証と、それに基づいた分級機構の高性能化への検討結果を述べる。

2. 細胞の外形の測定原理

本研究では、一定の大きさの球形であることを基準に細胞を選別する方法を検討した。フローセル中を流れる細胞の像を光学的に拡大し、その外形を複数の方向より走査し測長して、そのすべての値が等しければ円形で、もとの細胞が球形であると推定する⁹⁾。以下に測定原理を述べる。

図1は細胞の外形を測定する原理図である。細胞の像が一定速度 v で移動している時、移動方向に対して角度 θ 傾斜したスリットで、相対的に像を走査する。像の移動速度ベクトルを v 、スリット幅を w 、像1から像2の位置まで移動する時間を t とすると、スリットに直角な方向の像の寸法 d_0 は次式で表される。

$$d_0 = v \cdot \sin \theta \cdot t - w \quad (1)$$

図2に細胞の形状を3方向から計測して円形判別をする一例を示す。4本のスリット $S_1 \sim S_4$ を通して得られる光の信号波形を2値化し、その信号の時間間隔から細胞の外形寸法と細胞の流れる流線の位置を求める。図2(a)に示すように、 S_1 と S_4 は流れに直角に($\theta_1 = \theta_4 = 90^\circ$) 距離 L を隔てて配置し、 S_2, S_3 は角度 θ_2, θ_3 で配置する。図2(b)は各スリットから得られる2値化した検出信号である。信号の時間間隔を図のように $t_1 \sim t_5$ とすると、像の速度 v は

$$v = \frac{L}{t_4} \quad (2)$$

となる。像の3方向の寸法は式(1)から、それぞれ

$$\left. \begin{aligned} d_1 &= v \cdot \sin \theta_1 \cdot t_1 - w \\ d_2 &= v \cdot \sin \theta_2 \cdot t_2 - w \\ d_3 &= v \cdot \sin \theta_3 \cdot t_3 - w \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

となる。ここに $\theta_1 \sim \theta_3, L, w$ は既知の値であるので、時間間隔 $t_1 \sim t_3$ から形状が判別できる。例えば、 $d_1 = d_2 = d_3$ ならば像は円形で、またいずれか1つでも値が異なれば非円形と判断する。

(a) Traverse motion of cell image across the scanning slits

(b) Binary signal from a biological cell on a main streamline

(c) Signal from a flowing cell deviated from a main streamline

(d) Signal from a cell on a decelerated main streamline

Fig. 2 Detected binary signals from a biological cell on or off a main streamline through four scanning slits

一方、細胞の形状計測の精度を損なわないためには、デフォーカスによる倍率変化を生じることなく、細胞の像がスリット上に結像していることが大切である。そのためには、対物レンズの焦点位置となる主流線上を細胞が安定に流れることが必要である。ここでは、主流線上(一点鎖線)を最大とする流速分布の流れの中で、流速の変動の影響を受けずに、細胞の流れる流線の位置を求める方法について述べる。像の速度が変わるのは、①細胞の流れる位置が二点鎖線で示すように主流線から偏る時と、②細胞が主流線上を流れているにもかかわらず、主流線上の流速が低下する時である。

まず、上記①の場合を正常な状態と区別できるこ

Fig. 3 Schematic diagram of a classifier. Cells are classified into microchambers with a flow cell

とを示す。主流線上の像の速度を v 、 S_1 から S_2 を通過するまでの時間を t_5 、 S_4 を通過するまでの時間を t_4 とする (図 2 (b))。一方、主流線より δ だけ偏った流線上の別の像の速度を $(v - \Delta v)$ 、この偏りのため生じる S_1 から S_2 までの到達距離の差を x 、それぞれのスリットを通過するまでの時間を t'_5 、 t'_4 (図 2 (c)) とすると、次の関係式が成立する。

$$\left. \begin{aligned} L &= v \cdot t_4 = (v - \Delta v) \cdot t'_4 \\ x &= (v - \Delta v) \cdot t'_5 - v \cdot t_5 \\ &= L \cdot \left(\frac{t'_5}{t'_4} - \frac{t_5}{t_4} \right) \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

従って、細胞の位置の偏り δ は以下ようになる。

$$\begin{aligned} \delta &= x \cdot \tan \theta_2 \\ &= L \cdot \left(\frac{t'_5}{t'_4} - \frac{t_5}{t_4} \right) \cdot \tan \theta_2 \end{aligned} \quad (5)$$

次に、上記 ② の場合を ① と区別できることを示す。主流線上の流速が減速した場合 (図 2 (d))、主流線上の像が S_1 を通過後 S_2 、 S_4 を通過するまでの時間をそれぞれ t''_5 、 t''_4 とすると、時間比 t_5/t_4 と t''_5/t''_4 とは等しくなるので、式 (5) は零になる。以上の結果から式 (5) で δ を求めれば、流速の変動の影響を受けることなく、流線位置の偏り量が求められ、フローセル内の流れの安定性を判断できる。

Fig. 4 SEM photograph of the surface of a chamber plate

3. フローセルを用いた細胞の分級機構

図 3 にフローセルを用いた分級機構の概略図を示す。フローセルを流れる細胞の形状を判別し、チャンパプレート (以下プレートと略す) 上に配列されたマイクロチャンバ (以下チャンバと略す) に球形の細胞を注入する。フローセルの流路断面は $120 \mu\text{m}$ 角で、その上流に細胞懸濁液とシース液の供給管とが設けられている。両供給管からの流量を調整することにより、細胞懸濁液をシース液が取り囲んだシースフローが形成され、流路の中心軸上を細胞が流れる。フローセル中の細胞を He-Ne レーザ (0.5 mW) で照明して、移動する細胞の像を対物レンズでスリット上に 40 倍に拡大して結像させ、スリットの通過光をフォトマルで検出する。

図 4 はプレートの拡大写真である。細胞を保持する $10 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ の開口を持つチャンバと不要な細胞や破片を排出する $160 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$ のバージ孔がシリコンウエハにピッチ $770 \mu\text{m}$ で交互に形成されている。

図 5 にフローセルを流れる細胞とプレートの位置関係を示す。実際とは逆に、相対的にプレートが静止しフローセルが移動するように表し、細胞の軌跡を点線で示した。球形の細胞 B の前方に不要な細胞 A、後方に細胞 C が流れる場合に、細胞 B をチャンバに捕捉する方法について説明する。フローセルの先端とプレート面との間隔を $150 \mu\text{m}$ に保ち、フローセルの真下にバージ孔を位置決めして、フローセル内を順次流れる細胞の間隔と形状を計測する。フローセルの真下のバージ孔に細胞 A を排除し、次のバージ孔に細胞

Fig. 5 Related diagram between biological cell position in a flow cell and chamber plate

Cを排除する。レーザ光による検出位置 (S_1 に信号入力時点) からフローセルの出口までの距離を h , 細胞を排出可能な許容範囲を p_0 ($p_0 \leq (\text{ページ孔の入口寸法})/2$), 細胞Bの投下点前と後のプレートの移動距離を p_1, p_2 とし, プレートが停止状態から p_1 離れたチャンバ上にフローセルの先端が到達するまでの移動速度を v_1 , その後 p_2 離れた次のページ孔までの移動速度を v_2 とする。プレートが移動し始めてから細胞Aを最初のページ孔に排出可能な時間間隔の最大値を T_1 , 細胞Bを投下後, 細胞Cを次のページ孔に排出可能な時間間隔の最小値を T_3 とすると, 細胞Bをチャンバ直上で投下させるために必要な細胞Aとの時間間隔の最小値 T_2 は次のようになる。

$$T_1 = \frac{p_0}{v_1} \quad (6)$$

$$T_3 = \frac{p_2 - p_0}{v_2} \quad (7)$$

$$T_2 = T_4 - (T_1 + T_3) \\ = \frac{h}{v_0} - (T_1 + T_3) \quad (8)$$

ここで, 距離 p_0, p_1, p_2 , 移動速度 v_1, v_2 (最大値は定格速度), 細胞の流速 v_0 ($= (\text{像の速度 } v) / (\text{光学系の拡大倍率})$), 距離 h ($= 50 \text{ mm}$) の値は装置の仕様から決まる。従って, ① 目的の細胞Bを検出する時点より前に通過した細胞Aとの時間間隔が T_2 以上であること, ② 後続の細胞Cが時間 T_3 以内に来ないという2つの条件が満たされる時に, プレートを速度

Fig. 6 Magnified images and detected signal of a biological cell

v_1 ($= p_1 / (T_1 + T_2)$) で移動させると, 細胞Bだけをチャンバに注入できる。この条件に満たない細胞と不要な粒子はすべてページ孔に排出される。なお, これらの時間間隔は, 4本のスリットのうち最初のスリット S_1 を像が通過するたびにトリガをかけて行い, それぞれの時間間隔から演算して円形判別と上記の2つの条件の判別を行う。

チャンバの底の開口からは, 細胞の通り抜けを防ぐため圧力差 $50 \sim 100 \text{ Pa}$ で等張液を吸引している。ページ孔からも同じ圧力差で吸引される。フローセルからの流れは出口径の数倍に広がりページ孔に流れ込む。フローセルの先端がチャンバ上を通過する際には, チャンバの開口からの流量に比べてフローセルからの流量が数十倍と多いため, オーバフローする。このオーバフローに乗って細胞が流され拡散するのを防ぐために, フローセルからの流れの拡散幅がチャンバ入口寸法より小さく ($400 \mu\text{m}$ 程度) なるようにプレートを移動させる。この拡散幅は移動速度を速めると細くなる。本機構では, 拡散幅をフローセル出口径の約3倍以内におさえるため, 移動速度をフローセル内流速の $1/3^2$ 以上に設定し, チャンバ上で止まらずに細胞Bを受け取り, さらに前方に走り抜ける方法を採用した。

Fig. 7 Detected signal from biological cell image through four scanning slits

Fig. 8 Scanned signal of cell image corrected for intensity distribution

4. 実験および検討結果

図6にサラダナの細胞の写真と検出波形の一例を示す。検出信号のSN比を高めるため、検出光学系のブロックで零次光を除いて細胞(図6(a))からの散乱光像(図6(b))をスリット走査した。図6(c)は検出信号である。信号波形の幅と光学系の拡大倍率とから、細胞外径が $40\mu\text{m}$ と測長される。信号波形の先端形状は細胞質や葉緑体の分布に依存して変化する。信号波形の2値化はスリット幅方向に光の入る範囲、すなわち本装置の場合には最大光強度の約20%をしきい値として処理した。

図7に4本のスリット $S_1\sim S_4$ を用いて、活性な細胞からの信号の一例を示す。横軸は時間であり、流速から換算されるスケールとスリットの位置を示した。スリット幅は $40\mu\text{m}$ でクロム蒸着のマスクをパターンニングして作った。図6の信号の暗部のノイズに比べて図7のノイズが増しているが、これは、前者のスリットが金属箔製であるのに対し、後者がクロムマスク製でレーザー光を数%程度透過するためである。信号波形の4つのピークの中で両側の S_1, S_4 からの波形のピーク値が小さい。これはスリット板上で直径約 15mm に広がった照明光の照度分布によるもので、両側のスリット上の照度が内側のスリット上の65%に低下していることに起因する。この結果、破線のしきい値線上から求められる細胞の寸法は、各スリットによって値が異なる。すなわち S_1, S_4 ではそれぞれ $32\mu\text{m}$, $28\mu\text{m}$, S_2, S_3 ではいずれも $44\mu\text{m}$ ($=62\mu\text{m}\cdot\sin 45^\circ$)となり、両側のスリットでの測定値は約 $14\mu\text{m}$ 小さくなる。この照度分布による計測誤差を低減させるために S_1, S_4 の幅を $62\mu\text{m}$ ($=40\mu\text{m}/0.65$)に拡大して照度補正する方法を検討した。照度補正の効果をシミュレートするため、図7の S_1, S_4 か

Fig. 9 Measured characteristics of protoplast diameter with the classification system

らの信号の強度を1.5倍($=1/0.65$)に補正する波形処理をした結果を図8に示す。照度補正後の細胞の寸法は、 S_1, S_4 から $45\mu\text{m}$ となり、 S_2, S_3 からの $44\mu\text{m}$ とほぼ等しく、細胞の径をほぼ正しく測ったことになる。中心と周辺の値はなお $1\mu\text{m}$ の差があるが、スリット幅の増加分 $0.6\mu\text{m}$ ($=$ (スリット寸法差)/(拡大倍率))による照度補正を行わないと十数 μm の測定誤差の生じるところを、スリットの幅を照度分布に逆比例した寸法で形成しておくことによって、測定精度を一けた向上し $\pm 1\mu\text{m}$ 程度にできる。

図9に細胞の実寸法とフローセルによる測定値との相関を求めた結果を示す。細胞の実寸法と分級機構での測長寸法との間には点線で示すように相関が認められる。オーバーフローの影響を小さくするためフローセル内の流速を遅くし 25mm/s とした結果、供給ポンプ系が不安定となり $\pm 6\text{mm/s}$ ($\pm 24\%$)の流速変動

が生じた。この流速変動に伴って測長寸法値が見かけ上変わる範囲をドット領域で示した。この領域外のデータは流速変動によって細胞が主流線上を流れずデフォーカスして像が大きくなったものである。球形と検出される細胞数のうち約30%がデフォーカスによる誤差を伴っていた。従って、フローセル内の流れの安定化を図れば、これらの誤差を低減できるものと考ええる。

走行しながら細胞を容器に分級する際の注入点の位置精度を低下させる要因として、①フローセル内の流速変動による、チャンバ上への細胞注入点位置のずれと、②細胞がチャンバ内に落下する前にオーバーフローに流されることによる位置ずれとが考えられる。細胞の注入点の位置精度を求めるため、2か所のパージ孔間にチャンバを多数配列したプレートを用いて、任意のチャンバへの注入動作を反復した。直径20 μm 以上の細胞をカウントしたが18%は所在不明であった。82%は走行方向に $\pm 2\text{ mm}$ 、横方向に $\pm 1\text{ mm}$ の範囲内で散在し、入口面積 $0.52\text{ mm} \times 0.59\text{ mm}$ の目標のチャンバには55%が注入された。横方向への散在は、チャンバ間の稜線上で流出した細胞がオーバーフローに乗って流されることによる。走行方向への散在には、さらに注入点位置誤差が加算される。所在不明の粒子は、フローセル内の流速変動に伴うデフォーカスにより、10 μm 以下の小さな粒子の形状を大きいものと誤検出したため、注入動作を行ったにもかかわらずチャンバの開口を通り抜けて捕捉できなかったものと考ええる。従って、流速変動が改善されれば、細胞の形状検出精度と注入位置精度が向上できるものと考ええる。

本研究では細胞径の検出精度を調べるため、小さな開口のチャンバに細胞を個別に注入する方法を用いたが、フローセル内の流れを高速にできず流れが不安定となり、分級の効率が下がった。高精度な分級を行うには、分級後の細胞を集団として回収するようなシステム構成をとる必要がある。その具体的な方案は次のとおりである。

容器の入口径を2 mm以上とし、排出用の多数の細い開口を壁面や底に、その総面積がパージ孔面積と等しくなるように設計する。これにより容器の排水能力が向上できるので、フローセル内を安定に流れる流速(500 mm/s以上)にしてもオーバーフローを生じること

となく細胞を注入できる。この場合の容器は、例えばフィルタを底に設けた樹脂構造にすることもできる。このような容器を3×3のマトリクスに配列し、その中央をパージ用に使えば、細胞を直径で最大8ランクに分級できる。各容器に細胞を多数分級後、集団的に回収する。これによって、分級分解能は $\pm 1\text{ }\mu\text{m}$ 程度(現在の1/10)、容器への注入確率はほぼ100%(現在の2倍)、処理能力は800個/min以上(現在の40倍)になることが期待される。

5. 結 言

プロトプラスト化した細胞を損傷することなく分級する方法として、フローセルを流れる細胞を光学的に拡大し、その像を複数方向から走査して形状を測定し、等張液中で分級する方法を提案し実験的に検証した。

試作機による実験で、プロトプラストを $\pm 10\text{ }\mu\text{m}$ の分解能で分級して原理動作を確認した。さらに、①スリット板上の照度分布をスリット幅の寸法であらかじめ補正する。②入口径2 mm以上で、微細な開口を多数有した容器を配置し、細胞を多数注入後、集団的に回収する分級システムにする、等の改良を行うことにより、高性能な分級機構を構成できる見通しを得た。

参 考 文 献

- 1) 精密工学会：マイクロマシニングを応用した1対1細胞融合装置の開発，精密工学会誌，55，12（1989）業績紹介。
- 2) 河村喜雄，田中伸司，佐藤一雄，内田憲孝，小比田啓之：マイクロメカニカルデバイスをを用いた1対1細胞融合技術の開発，精密工学会誌，56，1（1990）86。
- 3) 内田憲孝，河村喜雄，高辻正基：1対1細胞融合装置の開発，BIO INDUSTRY，6，10（1989）755。
- 4) 河村喜雄，田中伸司，佐藤一雄，吉羽洋周，菊池次郎，高橋かほる：細胞の耐久性におよぼすプロトプラストの単離条件の影響，1990年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集，（1990）853。
- 5) 十川好志，戸田健三，高山慎一郎，三浦靖高，望月崇孝，岩崎 功：細胞電気融合，島津評論，44，1（1987）17。
- 6) 山形 光，高橋 滋：細胞工学におけるフローサイトメータの応用，BIO INDUSTRY，4，11（1987）887。
- 7) 高橋 滋：セルソータ，植物細胞工学，1，2（1989）153。
- 8) 川上友則，大野雄司，水野 彰：植物プロトプラスト用セルソータ液滴形成用ノズルの検討，静電気学会講演論文集'90，（1990）271。
- 9) 河村喜雄，小比田啓之，田中伸司，佐藤一雄：フローセルを用いた細胞の外径計測に関する研究，1991年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集，（1991）345。