自動生体細胞識別分離装置 (CS-5000) の開発

Development of the Automated Biological Cell
Analyzing and Sorting System "CS-5000"

○ 曾 我 博 ・ 館 龍 一 ・ 篠 原 彰 男

Hiroshi Soga, Ryuichi Tachi and Akio

Shinohara

昭和電工株式会社精密機器研究所

We have developed technology to identify and separate biological cells while they are alive and have fabricated the automated biological cell analyzing and sorting system "CS-5000".

The CS-5000 is a new flow-system instrument for quantitative analysis and sorting of microscopic particles, particularly biological cells, based on multiple measurements of physical and biological properties.

Cells stained with fluorescent dyes in liquid suspension are jetted out through a micro-nozzle at a high speed and are illuminated by laser beam as they flow in a stream. Optical sensors measure light-scatter, single- or two-color fluorescence. Sensor signals are electronically processed in several ways for optimum cell discrimination and displayed as pulse-amplitude distribution using a pulse-height analyzer. Sorting is accomplished by electrically charging droplets containing the cells and electrostatically deflecting them into collecting vessels.

Use of this system in biological and biomedical research and clinical medicine will greatly contribute to the further development of life sciences.

1. はじめに

レーザを光源とし、細胞浮遊液を流して個々の細胞毎にその特性を高速で分析するフローサイトメトリは、検出器の多様化と蛍光標識技術の著しい発達あるいはエレクトロニクス的发展によるデータ処理の高速、高度化等により、細胞分析法として重要視されるようになった。更にフローサイトメトリにより識別された細胞群の中から、特定の細胞集団を分取するソーティングの技術が加わったセル・ソータは、細胞に関する研究、臨床分析等にとって極めて有力な武器となる。

我々はかねてよりセル・ソータの開発に着手し試作機による評価、臨床応用を進めてきたが、このたびCS-5000として開発に成功したので、その内容について報告する。

2. 装置の構成

Fig.1は装置のブロック図を示すもので、大別すると次の4つの系より構成される。

- 1) 生理食塩水に浮遊した単一の細胞をレーザ光の測定へ送り込む細胞フロー系
- 2) ジェット流中を流れる細胞にレーザ光を照射し、散乱光あるいは蛍光等細胞の形質を検出する光学測定系
- 3) 散乱光あるいは蛍光等の検出された信号を

解析し、情報として表示、判定等の処理をする信号処理制御系

- 4) 特定の細胞群のみに対し分離信号を発し、細胞を分離捕集する細胞分離系

以下に各系について説明する。

2.1 細胞フロー系

細胞浮遊液および細胞を流れの中心にさへるためのシース液を流すための加圧源としてコンプレッサ（最高圧力3 Kg/cm²）を内蔵し、押釦操作により簡単に測定状態に入ることが出来る。

試験管等に入った細胞浮遊液は全体を加圧容器の内に入れ、Fig.1の中央部に示すフローノズル部に導かれ、シース液にさへられてノズルよりジェット流として噴出する。

測定点により（ⅰ）噴出後の空气中で測定する（Jet-in-Air）方式、（ⅱ）フローチャンバ内で測定する（Closed）方式があるが、それぞれ長所、短所があり、現在我々の装置では前者の方式を使用中である。

ノズル口径は50～200 μmの範囲でサンプル等の条件で変えるが、通常100 μmを使用する。

サンプル濃度は $\sim 10^7$ Cell/ml迄広範囲に対応できるが、装置の能力を発揮させるには $10^5 \sim 10^6$ Cell/mlが適当である。

通常シース液の生理食塩水を使用後そのままに

Fig.1 生体細胞識別分離装置構成図

Fig.2 ラテックス粒子のサイズ測定
(サンプル径 1 0.0 μm , CV=6.6 %)

しておく、ノズルチップ部が乾くにつれ塩が析出して、測定誤差や詰りの原因となるので、使用後に蒸留水による置換が自動的に行われるようにした。またサンプルラインも測定が終るとシース液が逆流して自動的に洗浄が行われ、サンプルラインが常に清浄に保れるようにした。

2.2 光学測定系

光源としては総出力 4 W の Ar イオンレーザを用い、このレーザビームを 2 枚の円筒レンズで断面が楕円形状 (幅 150 μm , 厚さ 20 μm) に絞り、細胞流に照射している。細胞はこのレーザビームに直角に流れる。

この細胞流より発せられる信号の検出器として

- ①前方散乱光 (Si フォトダイオード)
- ②緑色蛍光 (光電子増倍管)
- ③赤色蛍光 (光電子増倍管)

が装備されている。

散乱光は前方散乱のうち、 $\theta = 0.5 \sim 2.0^\circ$ の間の光を測定し、細胞の大きさと相関させている。更に 90° 方向の散乱は蛍光検出器を利用することで手を加える事なく可能である。

蛍光測定波長の変更はフィルタの変換により可能とした。また蛍光偏光フィルタを装着すれば蛍光偏光の測定が可能である。

各光センサで検出された信号はウィルキンソン方式の A/D 変換器で 256 チャンネルに分割されデータ処理される。

蛍光測定の感度は、CRBC と濃度既知の蛍光色素溶液との比較により蛍光強度の換算係数を計算し、これから CRBC 測定時の検出感度を蛍光

色素分子数に換算して求めた。その結果は、およそ 3000 分子/細胞の値を得た。

2.3 信号処理制御系

各光センサで検出された信号は、パルス波高値を A/D 変換し、チャンネル毎にカウント数すなわち粒子数として加算され記憶装置に蓄えられる。同時に取込む測定パラメータは 3 であり、細胞のカウント数は各チャンネル百万個である。

この読込データは逐次数値データ、図形表示 (ヒストグラム、二次元ドット表示等) がディスプレイ画面上に表示される。表示の更新周期は 1 秒である。図形表示としてヒストグラムの例を Fig. 2 に示す。

更に取込まれたデータはビデオプリンタ等により数値データ、図形の形でプリントアウトされる他、外部データ処理機へ送信してデータの解析や保存等が出来る。

細胞に関する情報が取り込まれ、あらかじめ分離したい細胞に関する情報と逐次比較され、設定範囲内であればタイミングを取って分離信号が発せられる。信号の検出から分離信号の発信まで 1 ~ 2 ms である。

2.4 細胞分離系

細胞の分離は、ノズルより吹出したジェット流が超音波振動により液滴とされ、この液滴の中に特定の細胞が入って瞬間に正又は負の電荷を与え、静電場を通過する際偏向されることにより行なわれる。

超音波振動によって作られる液滴は、ノズル口径が 100 μm で 30,000 個/秒ほどであり、200 V の荷電パルスが加えられ、 $\pm 2 \text{ KV}$ の偏向電圧により方向を変えられる。

細胞の分離に際し、(i) 回収率を優先する処理、(ii) 純度を優先する処理が選択できるようにした。これは、分離すべき細胞が貴重で少ない時は前者を、回収率が悪くても不要の細胞の混入を嫌う時は後者を選択する方式とした。なお、装置の能力を最大限発揮させるには、ノズル口径とサンプル濃度を最適に選ぶ必要がある。

分離条件の設定には、シングルパラメータとダ

Fig.3 DNA分布測定によるセル・サイクル解析の例
(HeLa細胞+アルキル化剤)

ブルパラメータを設けた。

細胞分離の際は雑菌の混入を避ける等の目的で外界との遮断を計るようフロー系も含めて密閉構造とした。更に分離系を加圧あるいは減圧状態で使用できる構造とし、途中で滅菌フィルタを挿入している。

3. 測定例

本装置(CS-5000)を用いて測定した結果を以下に記す。

Fig.2は標準ラテックス粒子として市販されているもの(10 μ m:Duke)を散乱光により測定したもので、横軸は散乱光強度すなわち粒子の大きさを表す。ラテックスメーカーによるバラツキの測定値はCV=6.6%であり、我々の装置ではCV=4.8%の値を得た。

Fig.3は、DNA分布測定によるセル・サイクル解析の例を示す。サンプル細胞はHeLa Cellで、アルキル化剤処理によるセル・サイクルの変化の様子を測定した。測定結果によれば一定時間経過後のDNA分布が明らかに影響を受けている事を示している。

本装置を臨床に応用したものとして、東北大医

学第2外科における「腎移植時における拒否反応の検知」の報告がある。これは移植患者のリンパ球の大きさの分布を本装置で測定し、そのパターンの変化から拒否反応を判定するもので、従来の方法にくらべ2~3日早く検知できる他、処理が簡単で測定時間も短い等の結果を得ている。

4. おわりに

フローサイトメトリ方式による自動生体細胞識別分離装置の開発を進め初期の目的を達することができ、今後我国において、医学、生物学等の分野において大いに利用される装置と考えられる。今後も更に改良を進め高機能化をはかっていく予定である。

本装置の開発にあたり種々の面で御指導戴いた東北大学医学部第2外科葛西教授、田口講師、東北大学電気通信研究所稲場教授、山岸助手(現大阪大学助教授)、田久技官に感謝致します。