

1. はじめに

細胞の分離と回収は、培地交換や継代における培養中の細胞の洗浄、デブリの除去、播種および融解など、ほとんどの細胞培養をベースとした実験に不可欠な手順です。今日まで、細胞収集は遠心分離機を用いて細胞をペレット化することによって達成されてきました。遠心分離は、粒子の形状、サイズ、密度、およびローター速度に基づいて、溶液から粒子を分離および沈降させる方法です。ローターの回転は、液体培地および生物学的遠心分離中の細胞に遠心力を発生させ、この遠心力を用いて細胞混合物を分離精製するプロセスです。細胞は加えられた遠心力に比例した速度で沈降し、遠心分離機から供給される強い遠心力が、サンプル中の細胞に印加されます。遠心力の増加は、細胞に機械的ストレスを誘発し、炎症過程に関与するサイトカインを産生する可能性があります¹。また、遠心分離による重力場は、細胞のメカノレスポンス²の一部として、細胞の牽引力や細胞骨格の再配列の変化を引き起こすことも報告されています。

Curiosis Inc.は、流体せん断応力の発生をわずか数秒に削減し、細胞への機会的ストレスの影響を最小限に抑える、遠心力のない細胞濃縮装置であるCellpuriを開発しました。さらに、遠心分離とは異なり、分離後に上清を慎重に除去する必要がなく、細胞濃縮物を得ることができます。本研究の目的は、新開発の細胞濃縮チップの性能を従来の遠心分離法と比較して検証することにあります。

2. 材料と方法

細胞の調製

7種類の付着性または浮遊細胞株を用いて、Cellpuriの性能を試験しました。Jurkat、HL60、RajiおよびK562細胞を浮遊細胞の試験に含め、NIH3T3、HeLaおよびMCF7細胞を接着細胞株として使用しました。培養容器から直接浮遊細胞を取り出し、トリプシン処理と培養培地添加後に培養容器から付着細胞を取り出しました。すべてのタイプの細胞を、性能実験を評価するために 2×10^5 cells/ml または 2×10^6 cells/mlの濃度で希釈しました。

生細胞および死細胞の濃度の測定には、自動セルカウンター、FACSCOPE(CURIOSIS社)を用いました。HL60細胞を200gで10分間遠心分離し、上清をピペットを用いて慎重に吸引し、遠心分離機の収率と比較しました。

Cellpuriの操作

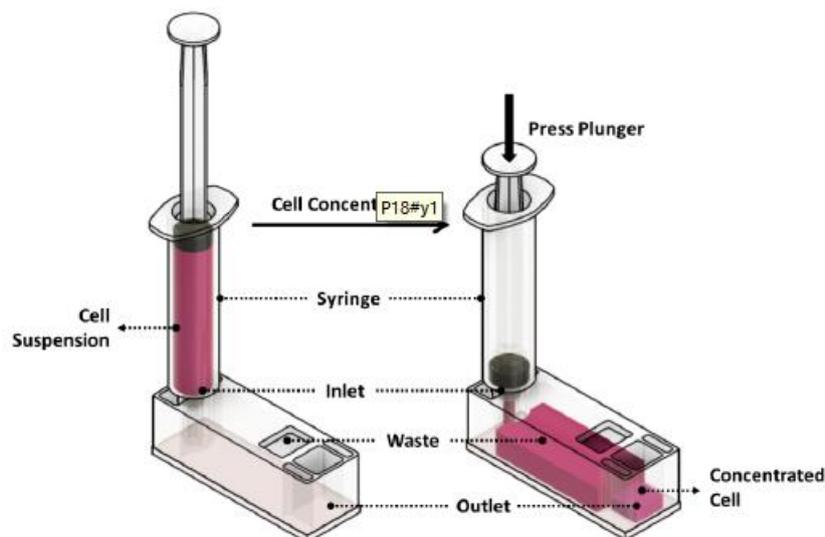


図1. チップ動作の説明図

取扱説明書の記載に従い、調製した細胞をルアーロックタイプのシリンジに充填し、シリンジ先端をCellpuriのInletに接続し、シリンジポンプ(CURIOSIS社製)を用いてシリンジプランジャーを押圧し、細胞懸濁液をチップ内に注入しました(図1)。操作終了後、ピペットを用いて濃縮した細胞をCellpuriのOutletから回収しました。濃縮中に除去された無細胞培地およびデブリは廃棄物 (Waste) として廃棄しました。

Cellpuriによる、濃縮度と収量の測定

細胞は、細胞懸濁液がチップを通過する間に、そのサイズ、形状および変形能に応じて分離されます。濃縮度と歩留まりは、チップの性能を評価する際に考慮すべき重要な要素です。

濃縮度は次のように定義されます。

$$\text{Enrichment} = \frac{\text{Cell concentration at the Outlet}}{\text{Cell concentration at the Inlet}}$$

収量は下記のように定義されます。

$$\begin{aligned} \text{Yield (\%)} &= \frac{\text{the number of cells at the Outlet}}{\text{the number of cells passing through the chip}} \times 100 \\ &= \frac{\text{the number of cells at Outlet}}{(\text{the number of cells at the Waste area}) + (\text{the number of cells at the Outlet})} \times 100 \end{aligned}$$

3. 結果と考察

遠心分離による細胞ペレット化は、細胞と混合した培地を除去することにより細胞を濃縮することを可能にします。Cellpuriが細胞のスピンダウンなしに細胞を効率的に濃縮できることの実証することが試みられました。また、付着細胞株と浮遊細胞株におけるCellpuriの濃度効率を、異なる2つの初期濃度で測定した結果、Cellpuriでは細胞の濃縮率は初期濃度と比較して平均で約22.79倍であることが確認されました。浮遊細胞は、低濃度において23.52倍、高濃度で21.37倍濃縮されることがわかりました(図2A)。付着細胞でも、低濃度で24.55倍、高濃度で21.93倍の濃縮が確認できました(図2B)。浮遊細胞と接着細胞の両方で観察された濃縮に優位差がなく、Cellpuriは細胞種に関係なく使用可能であると予測されます。

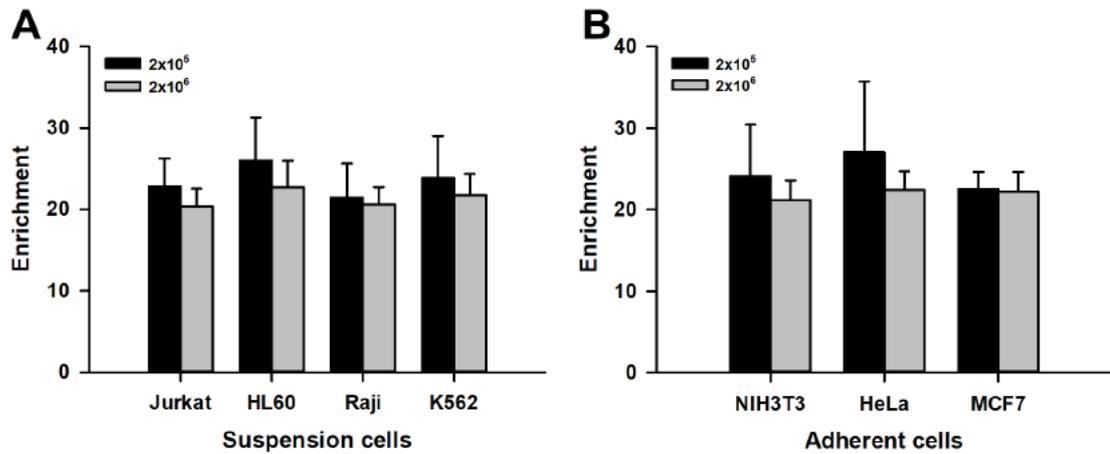


図2. Cellpuriを用いた異なる濃度での濃縮度評価

(A) Jurkat (n=12)、HL60(n=10)、Raji (n=16)、562(n=16) (B) NIH3T3(n=10)、HeLa(n=6)、MCF7(n=9)

Cellpuriチップを用いて濃縮された細胞の収率は、付着細胞株と浮遊細胞株の両方で平均94.92%であることが検証されました(図3Aおよび3B)。

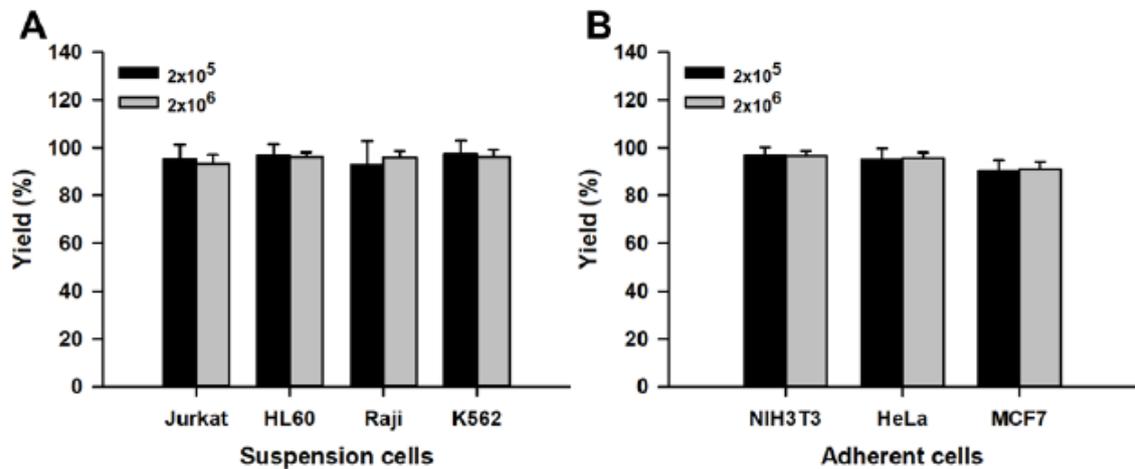


図3. Cellpuriを用いた異なる濃度での収量評価

(A) Jurkat (n=12)、HL60 (n=15)、Raji (n=16)、K562 (n=16) (B) NIH3T3 (n=10)、HeLa(n=6)、MCF7 (n=9)

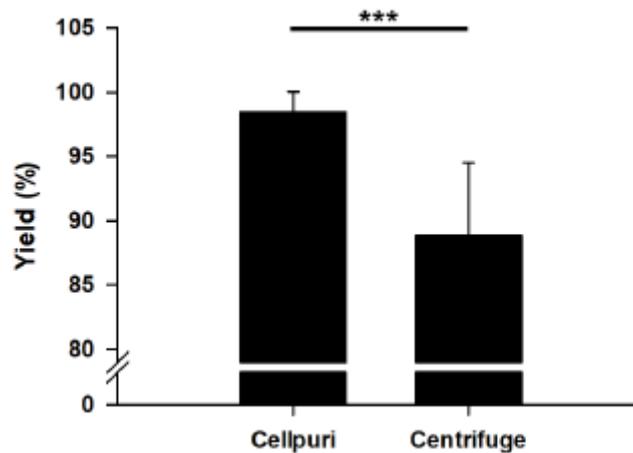


図4. Cellpuriと遠心分離機における収率比較

P値(*** $p < 0.001$, unpaired t-test)は、チップと遠心分離機間の収率の統計的に有意な差を示す。エラーバー、s.d. (n≥10)

遠心分離で細胞をペレット化する場合、穏やかなピペット吸引にて培地上清の除去をしますが、同時にわずかながら細胞の損失があります。そこで、Cellpuriと遠心分離のHL60細胞の収率を比較しました。図4に示すように、遠心分離では、吸引後の細胞損失のため回収率が低下し、細胞濃縮チップが98.44%であるのに対し、遠心分離では回収率が88.87%まで低下することがわかりました(図4)。

以上の結果により、Cellpuriは極めて高い回収率で細胞を濃縮でき、培地上清の除去処理を省くことができるため、遠心分離の代替手段として、細胞濃縮の効率的な手段となりうることが期待されます。また、遠心分離で細胞を濃縮する際は、5分以上遠心力に晒されますが、Cellpuriでは、細胞はチップを通過するせん断力の影響をほんの数秒間しか受けません。これは、Cellpuriでは、細胞が機械的ストレスにさらされにくく、遠心分離法と比較して細胞機能への影響が最小限であることを示しています。

4. 参考文献

- [1] HG Kim et al. Mechanical stress induces tumor necrosis factor- α production through Ca^{2+} release-dependent TLR2 signaling. *Am. J Physiol. Cell Physiol.* 295, 2 (2008)
- [2] Eckert J et al. Hypergravity affects cell traction forces of fibroblasts. *Biophys. J.* 120, 5 (2021)

Cellpuriについて

Cellpuri™は、遠心分離なしで細胞濃縮ができるディスプレイチップです。このチップは、細胞懸濁液が通過するマイクロチャンネル内のレオロジー現象を利用して細胞を濃縮し、培地をろ過します。チップは、細胞懸濁液が装填される Inlet、細胞濃縮懸濁液が収集される Outlet、培地(廃棄物)が充填される Waste から構成されます。Cellpuri のサイズは 76(w)×26(d)×23(h)mm で、2~20mL の細胞懸濁液を 1.5mL/min の速度で処理できます。さらに、Cellpuri は、10~20 μ m のサイズで細胞を濃縮することができます、元の細胞濃度に対して 20 倍以上の濃縮が可能です。