オンチップ密度勾配遠心法による細胞分離の実時間蛍光観察

03-130211 田村大樹 指導教員 鷲津正夫教授

1 研究背景

血液細胞は、白血球と赤血球に大別できるが、生体の恒常性維持のため、とくに白血球数やそれらの膜表面に発現される様々な抗原は一定の範囲内に維持されている。しかし、感染症等にかかり健康状態が変化すると、特に白血球の数やそれらの表面抗原の発現状態が変化するため、血液細胞を分離し表面抗原の発現状態を解析することによって、感染症を診断し、適切な治療を行うことができる。

細胞膜表面抗原は、その抗原に対して特異的に反応するモノクローナル抗体により分類され、CD 分類と呼ばれる。特定のCD の同定やその計数は、そのCD 抗原に対する、蛍光標識されたモノクローナル抗体を作用させて蛍光観察することで行われており、現在はフローサイトメトリーにより実用化されている。しかし、フローサイトメータは大型かつ高価な装置であり、扱いに熟練が必要である上、結果が出るまでに時間を要するという欠点がある。従って、より迅速かつ安価に解析を行えることが必要とされている。

2 目的

血液細胞を解析する別の方法として、密度勾配遠心法により 血液細胞をその比重ごとに分離し、分画した細胞に対して特定 の CD 抗原に対する蛍光標識付きモノクローナル抗体により 染色して蛍光を観察するという方法が挙げられる。

当研究室では、音楽用コンパクトディスクと同様の大きさのディスク上に作製した液槽に、遠心力によって連続的な密度勾配を作製し、更に試料を入れて回転させることで密度勾配遠心を行うという、小型遠心分離デバイスの開発を行っている(図1,2)。ディスク上のマイクロスペース内に容易な操作で再現性良く安定的に密度勾配を作製することが可能である。また遠心分離の様子を実時間観察を可能とする。

本研究では、小型遠心分離デバイスの実用化を図るため、作製した密度勾配の定量的な計測を行うとともに、蛍光観察を可能にすることを目的とした。



図1 本デバイスの上面図

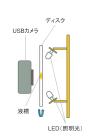


図2 本デバイスの側面図

3 連続密度勾配の計測

密度勾配を計測する方法としてカメラで撮影した画像から吸光度を測定し、密度勾配を計算する方法を試みた。既知の濃度の色素溶液の吸光度を測定した結果、濃度と吸光度に比例関係を確認でき、吸光度をもとに密度勾配を定量的に計測することができた。また、比重が既知であるビーズを予め作製した連続密度勾配中に導入して遠心し、分離された位置と、吸光度をもとに測定した密度勾配が一致することが確認できた(図3)。

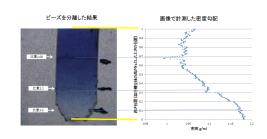


図3 計測した密度勾配と分離されたビーズの位置を比較

4 蛍光観察

蛍光染色した Jurkat 細胞を連続密度勾配で分離し形成されるバンドを、LED とバンドパスフィルタを用いて蛍光観察を行うことを試みた。ディスクを静止させた状態では個別の細胞の蛍光観察が可能となり (図 4)、ある程度細胞数が多い状態では、遠心によって細胞がバンドを作る様子を実時間で蛍光観察を行うことが可能となった (図 5)。

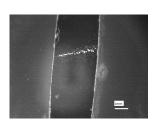


図 4 静止させた状態で撮影 した Calcein 染色した Jurkat 細胞のバンド



図 5 回転させた状態で撮影 した Calcein 染色した Jurkat 細胞のバンド

5 結論

以上から、連続密度勾配の定量的な計測や、細胞が遠心によりバンドを作る様子を実時間で蛍光観察を行うことが可能となり、本デバイスの実用化に貢献することができた。