HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	多試料ろ過器を用いた細胞収集装置とその応用
Author(s)	坂井, 留女; 小幡, 文弥; 塩川, 洋之
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 35, 18-23
Issue Date	1975-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26490
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_P18-23.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

多試料ろ過器を用いた細胞収集装置とその応用

坂井留女　小幡文弥　塩川洋之
(北海道大学免疫科学研究所生化学部門)

(昭和49年9月30日受付)

細胞のブラスト化の目安として,^{3}H-チミジンのDNAへの取り込み量の測定が一般に行なわれている[1]。この場合，細胞を^{3}H-チミジンと一定時間培養し，その後ろ紙上に集め，トリチウム量を液体シンチレーションカウンターで測定する[2),3)]ことが多い。

私達は遅延型過敏症を細胞レベルで研究しようとしている。個体レベルでの皮膚反応に対応する細胞レベルでの応答を，抗原による免疫担当細胞のブラスト化で観察することにして，上に述べた測定原理を採用した。しかし，使える細胞数に較べ，至適培養条件を決めるために必要な実験数が多く，一般に行なわれている方法よりも細胞数を減らした実験を組む必要性が生じた。検討の結果，培養器として直径4 mmの穴をもつFalconのミクロテストプレート#3034を使うことに決めた。この実験をする際，次の二つの点

① ミクロテストプレート上の小さな穴から細胞を取り出す手段

② 能率良く多くの培養穴中の細胞を処理する方法

が問題になった。多試料ろ過器は市販されているが，高価な上にこれを使っても①は解決できない。最近になって，Hartzmanらは半自動多試料ろ過装置を用いて短時間に多くの細胞試料をろ紙上に集める方法を報告した[4]。彼等の装置は，細胞をろ紙上に集めると同時に，細胞培養穴と細胞を洗うことが出来る装置で，上の二つの問題をうまく解決している。その後似た原理を用いているが工夫を加えた装置が報告されている[5),6)]。我々も又，Hartzmanらの装置と原理は同じであるが，二，三の工夫を加え廉価にかつ使い易い，多試料ろ過器を用いた細胞収集装置を製作したので，その製作方法，この装置の使用法，その特長および限界について記述する。加えて，ろ過器より前の部分と後の部分を変更し，文字通りの多試料ろ過装置をも試作し実際に用いているので，それについても述べる。

(1) 多試料ろ過器を用いた細胞収集装置

装置の説明(製作法)：装置の全体写真を写真1に，全体図を図1に，ろ過器の部分の拡大図を図2に示した。図1のAは1ℓのイルリガートルで生理的食塩水溜である。生理的食塩水は，その流量を調節するスクリューコック(B)と流れを断続させるためのピンチコック(C)のついたシリコン管とポリエチレン管を通って(D)の等液量分配用の槽にはいる。槽は6.5 cm×6.5 cm×2.0 cmのアクリル製の中空直方体である。この槽は上部に生理的食塩水流入のためのポリエチレン管と一定量の生理的食塩水をためるときの空気抜(注射針利用)(E)をもち，下部はFalconのミクロテストプレート#3034(図3)上の培養穴中の細胞を洗い流すための6本の管(以下流入管と呼ぶ)と接続している。流入管は培養穴に至る前にもう一つの管(以下流出管と呼ぶ)と合する。この管は培養穴から細胞を圧力差を利用してろ紙の上に運び，さらに培養穴を洗った生理的食塩水を流し去るための管である。流入管と流出管は共に金属性で，これにはディスポーザブル注射針(18 G)を細工して当てた。流出管は流入管よりも下につき出ており，流出管の先端はポリエチレンのチップで覆われている。培養穴から流れ出た細胞は，流出管とそれに続くポリエチレン管を経て多試料ろ過器(G)にいたり，ガラス繊維ろ紙上に集めら

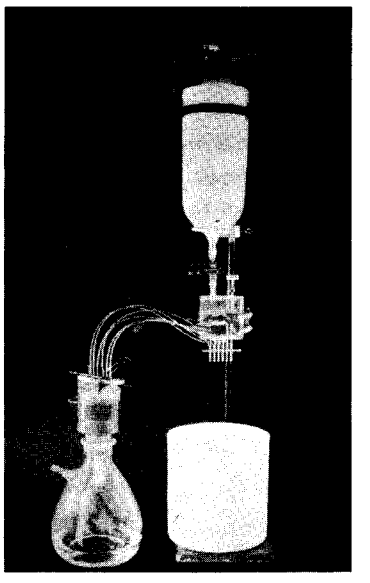

写真1　多試料ろ過器を用いた細胞収集装置

れ，培養穴を洗った生理的食塩水で洗われる。ろ液はろ液集合部(H)を経て，1ℓガラス吸引びんのろ液溜(I)に集められる。ろ液集合部はアクリルの管・板と太いポリエチレン管が真中を通っているゴム栓からできている。生理的食塩水は，生理的食塩水溜から流入管までは液が作る圧により流れ，流出管からの後半では，圧ろびんを経てつけられたアスピレーターにより作られる圧力差により流れる。ろ過器は，培養に用いたのと同じミクロテストプレート#3034，光和機材025-S00-10，25mm SSサポートスクリーン(うち抜き型)とライオン事務器(福井商事KK製)810-20009，N200のダブルクリップ(特大)を用いて作った。上記プレート(図3)を縦にC列とD列を境に二つに断つ。BとE列の2, 3, 4と6, 7, 8番目に板をつらぬく穴をあけ，上部に当たる板の穴には18Gの注射針を利用した管を，下部の板の穴には同じ太さの注射針かそれ以上の太さの金属管を板の裏側からアラルダイトで糊付けした。

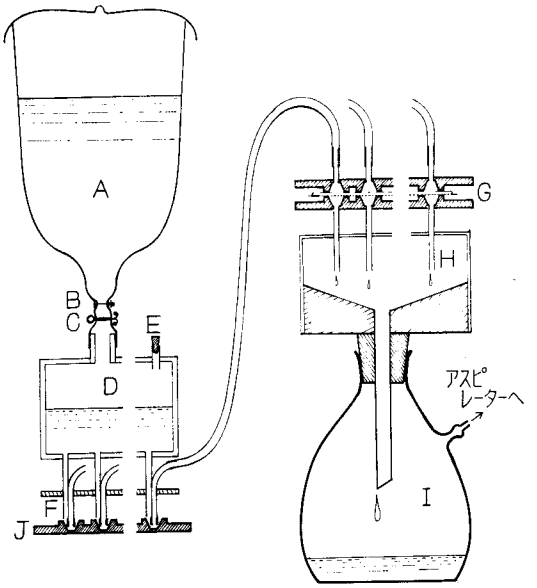

図1　多試料ろ過器を用いた細胞収集装置

A. 生理的食塩水溜(イルリガートル)
B. 流量調節コック(スクリューコック)
C. 断続コック(ピンチコック)
D. 等液量分配用槽(アクリル製)
E. 空気抜用コック(注射針利用)
F. 6組の流入管と流出管束(注射針とポリエチレン管利用)
G. 多試料ろ過器
H. ろ液集合部(アクリル管・板とゴム栓利用)
I. ろ液溜
J. 培養板

穴をうがった培養穴に隣接した穴のうち，前者に面した側壁部分を削り取った。上下板を本来の培養穴を内側にして重ねて使うのであるが，A1, C10, F1, D10に穴をあけ，釘を差し込んで，二つの板を容易に正しく向

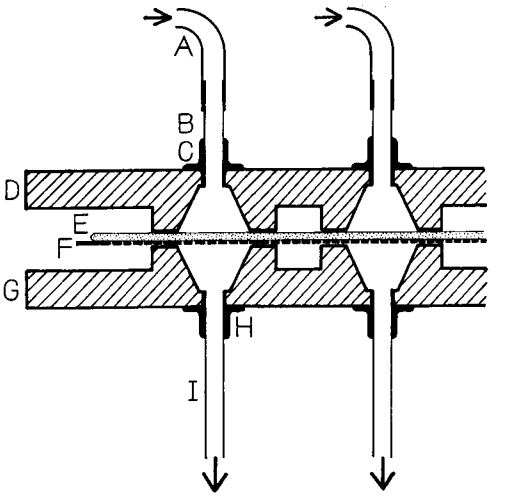

図2　多試料ろ過器

A. ポリエチレン管(流出管に接続している)
B, I. 金属管(ディスポーザブル注射針(18G)利用)
C, H. アラルダイト
D. ろ過器上板(Falconミクロテストプレート#3034利用)
E. ガラス繊維ろ紙
F. うちぬきステンレスサポートスクリーン
G. ろ過器下板(Falconミクロテストプレート#3034利用)

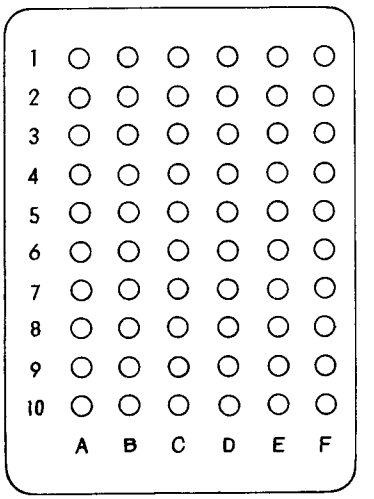

図3　Falconミクロテストプレート#3034模式図

き合わせることができるようにした。

ろ過器とろ液集合部との間を開けたのは，穴に沿って二つのダブルクリップでろ過器を上下から固定するときにクリップをそう入しやすくしたためである。

使用方法：まず，生理的食塩水溜に生理的食塩水を入れ，等液量分配用槽の空気抜き用栓をはずし，生理的食塩水溜から等液量分配用槽に生理的食塩水を4 cm 程の高さになるまで移し，栓を閉じる。それと同時に，ピンチコックで生理的食塩水の流れを止める。上に記したスクリーンをろ過器の下板にのせる。現在うち抜きスクリーンで容易に入手できるものはここに掲げたものが最大であり，大きさに制限があるため，三つの連続穴を二つ作ったわけである。この連続穴当たり一枚のスクリーンを使う。この上に東洋濾紙KK製のガラス繊維ろ紙GB-100を1 cm×5 cm に切って載せ，これにろ過器上部を二つの釘を利用してうまく重ね，クリップを穴にできるだけ近づけてとめる。アスピレーターで圧力差を作る。流出管とろ過器を結ぶ管中の水がろ過器の向きに動くのを全部の管について確認した後，ピンチコックをシリコン管から硬いポリエチレン管に移すことにより開く。流入管の先端から生理的食塩水が出てろ過器に向うのを全部の組について確認する。スクリューコックを使って，生理的食塩水が流出入管から滴になって落ちない様に，しかし十分量の生理的食塩水がろ過器に流れ込むように調節する。これらすべての点検と調節が終わったとき，培養板を流出入管束に近づけ，一つの穴に対して一組の流出入管を割り当てるように位置をきめ，培養板を流出入管に軽く押し当てる（～1 秒)。これを30回繰り返した後，ピンチコックをシリコン管にずらして閉じ，生理的食塩水を止める。すべてを常圧に戻す。その後，クリップをはずしろ紙を取り出す。

より簡便な製作法：簡易型等液量分配用槽と流出入管を写真2に示した。この槽は太めのガラス管を10 cm 程の長さに切断し，両端に（シリコン）ゴム栓をする。上部に当たる栓には，生理的食塩水溜につなぐためのガラス管と注射針（18 G）をゴム栓をつきぬけるように差し込む。注射針は空気抜用で，栓に市販の注射針に接続できる三方コックを使うと工作の手間がはぶける。下部に当たるゴム栓にはディスポーザブル注射針の頭の部分を削り刃先を利用して必要数だけ差し込む。流入管と流出管は適当な板の上に望む間隔で注射針を利用した管をおきアラルダイトで固定する。流入管と等液量分配用槽の下部の金属管をできるだけ短かいポリエチレン管で結ぶ。この様にして作った等液量分配用槽と流出入管を図1のD，EとFに換えて，Falcon ミクロテストプレート#3040で培養した細胞を集めてみたところ成功し満足した結果を得た。このプレートは Hartzman らが報告したミクロ法に使われているものである。上と似たアイデアで，ろ液集合部をガラス管，ゴム栓，注射針を使って作り，ろ過器とポリエチレン管でつなぐことが可能である。

この装置の長所と限界：長所として，Hartzman らの装置にくらべ廉価にかつ手軽に作れること，手軽に扱えることがあげられる。これは以下の理由によると思われる。

① 等液分配用溜の容量を多くして，流入管にかなり均等に生理的食塩水が流れ込むようにすると共にスクリューコックでその量が容易に変えることができるようにした。

② Hartzman らの方法とは逆に流出入管を固定しミクロテストプレートを動かすようにしたので，培養穴の洗浄に力を必要としなくなった。

③ ろ過器を次節に述べるように工夫した。

④ 生理的食塩水以外の液で細胞を洗いたい時，彼等のようにいくつかの溜を作りその切り換を考えることをしなかった。

生理的食塩水以外のもので細胞を洗いたいときには，使用法で述べた生理的食塩水による洗浄後，洗液に流出管の先端を浸し，吸わせると良い。トリクロロ酢酸溶液を使うときには錆にくい良質の金属管を使う必要がある。

この装置の限界は，主としてろ過器のろ過面の大きさ，

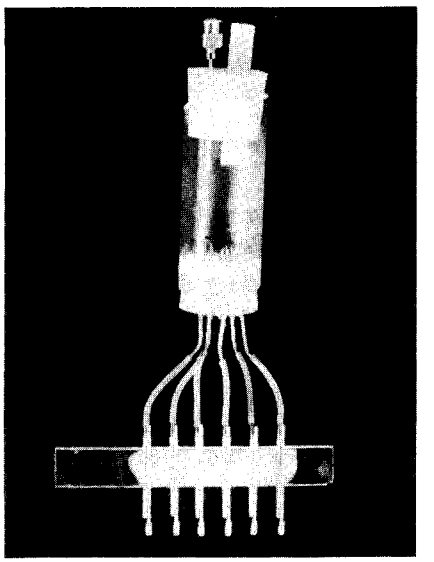

写真2　簡易型等液量分配用槽と流出入管束

性能に依存しているようである。これに関連したことは次節でふれる。上に述べた装置と使用法に限って検討すると，培養穴あたり 2×10^6 個以下の細胞しかろ過することが出来ないのが一つの限界である。

また使用トリチウム数量が少ないので希釈しただけで捨てているが，数量が多くなればホット用とコールド用のろ液溜を分けて作らねばならずその時には切り換法を考えねばならない。

Harrison らの装置[5]はろ液を別々に集める装置で，ろ過器とろ過器より前の部分は Hartzman らの方法と類似している。ちょうど，我々の細胞収集装置のろ過器より前とろ過器と (3) にのべる多試料ろ過装置のろ過器より後の部分を継ぐと彼等の意図するものと合致するようになる。Sanderson らの方法[6]はペリスタルチックポンプを使って培養液と洗液をディスポーザブルミクロフィルターに送る方法で，前二者とは異なっている。実物をみないのでわからないが，両者とも Hartzman らの方法より洗液の流量の安定性が保証されているようである。既報のこれらの方法は工作専門家に製作を依頼しなければならない程仕組が複雑ではあるが，我々の方法より自動化されているなど便利な点をもっている。しかし，ろ過器の穴をあける以外機械を使わずに一般の研究室で作ることが出来る我々の装置は上に述べた装置にくらべ特に性能が劣るということはないようである。

(2) 多試料ろ過器

市販されている圧力差を利用したろ過器をみると，ろ紙をろ過器に装てんする場合，

① O-リング等のパッキングを用いてしめるか

② ガラスまたは金属の重さを利用してろ紙をおしつけた上，金具を用いて固定することにより液のもれを防いでいる。①は小容量から大容量のものを，②は比較的容量の大きいものをろ過する場合に使われている。(1) で製作法と使用法を述べ，ろ過器の図を図2に示したが，我々の方法はどちらかといえば②に属する。しかし，我々のろ過器自身はポリスチレンでできていて非常に軽い。

図2を参照しながら，我々のろ過器の構造上の重要と考えられる点を上げてみる。

① 上板はろ紙を押しつけるための凸面をもつこと。これはクリップが加えた力をせまい面積に有効にかけることが出来るので大切と思われる。また液が凸面の外側まで広がることが多いので，ろ過穴間の汚染をさけるのにも重要である。

② スクリーンは曲りにくく，上板および下板と接する面積よりも十分に小さい面積の孔をもつうちぬきスクリーンであること。これがかなえられない時には，圧のもれと液もれが生じるであろう。

③ クリップは圧もれまたは液もれがないように十分に板をおさえる力があること。いくつかのクリップを試みたところ，ダブルクリップがもっとも良かった。

以上が重要な点と思われるが，下板が凸面であることが大切なことかどうかは不明である。

使用出来るろ紙の種類について知るため，パイロット社のインク，ロイヤルブルーを希釈して，液のもれがあるかどうかを調べた。ろ過器は流出管に続くポリエチレン管をこれからはずして，(1) で述べた使用法に準じて用いた。ワットマン社の液相分離ろ紙 No. 1 PS はそのままで使えた。試した紙製のろ紙の多くはぬらして使用すると凸面を越えて拡がるが，ろ過穴間の汚染はなかった。メンブレンフィルターは二つの社のバブリングポイントの異なるものについて調べたが，すべて使えることがわかった。ただし，バブリングポイントの高いものは途中空気を入れないように注意することが必要である。ガラス繊維ろ紙についてみると，東洋濾紙 KK 製の GB-100 は問題なかったが，ワットマン社の GF-A，B および C 共に，ろ紙の網目がみえる側にろ過器の凸面を越えてにじみがみられた。しかし，^{3}H-チミジンを取り込んだ細胞を (1) の方法で処理するとき，東洋濾紙 KK 製の GB-100 のかわりにワットマン社の GF-A, B と C を使ってみたが，ろ過穴間の汚染はトリチウムのカウント数からは観察されなかった。

ろ過穴間の汚染は次の注意を守ることによりかなり防ぐことができる。

① 二つのクリップを互いにできるだけ近づけろ紙をおさえる力が大きくなるようにする。

② 減圧が十分になってから試料をろ過器にかける。

③ 試料を完全にろ過してから常圧に戻し，次にクリップをはずす。

多試料ろ過器として，何個の試料が一度にかけられるかは，スクリーンの丈夫さと大きさ，クリップの形と力の大きさに左右されるであろうが，(3) で述べる多試料ろ過装置では，12 個の試料が一度にろ過出来るようになっている。

(1) でろ過できる細胞数に限りがあることを述べたが，これはろ過面の大きさによるものと思われる。ろ過面を拡げることは実際にやってみて径が約 1 cm までは可能であった。それ以上の径はためしていないが，上と同様スクリーンとクリップの形と性能に依存するであろう。ここに述べた 1 cm の径のろ過器というのは，ディスポーザブル注射筒の外筒の内筒差し込み口を利用したもの

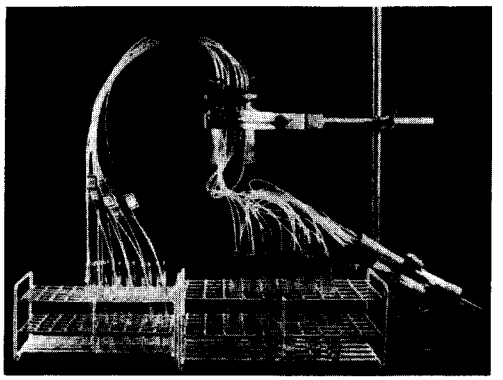

写真 3　多試料ろ過装置

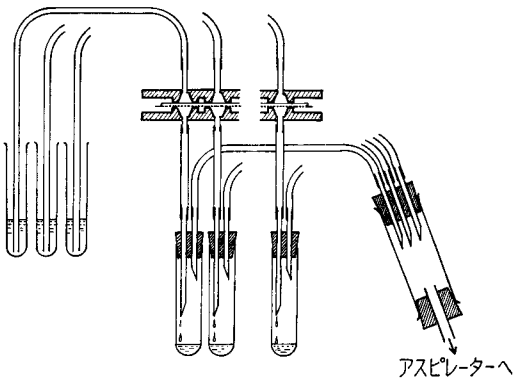

図 4　多試料ろ過装置

である。この様に多試料用のみならず単一の試料用ろ過器としても使える。この場合には凸面の面積は液の損失を考えなければ，多少広くても問題はないようであった。

(3)　多試料ろ過装置

装置の説明：写真 3 と図 4 に多試料ろ過装置の写真と全体図を示した。多試料ろ過器は (1) で述べたように Falcon のミクロテストプレート #3034 を利用して作ったが，6 個の穴を 2 列にし，計 12 個のろ過が一度に出来るようにした。ろ過器より前の部分は試料を吸い取るためのポリエチレン管束からなる。後の部分はろ液が一試料ずつ取れるように試験管にゴム栓をし，これに二本の金属管（以下金属管はすべてディスポーザブル 18G 注射針利用）を差し，試料が流れ込む方の管をやや長目に差し込み，ポリエチレン管でろ過器につなぐ。減圧にするために，もう一本の管はポリエチレン管と金属管を経て，最終的にはアスピレーターに連結される。この金属管は計 12 本あるが，すべてをアスピレーターに連結する前に，一つの空間に集める。それは太いガラス管にゴム栓をし，それに 12 の刃先を差し込み，ガラス管の他端をアスピレーターにつなぐ管をもつゴム栓で閉じることによりはたされる。

実験例：ブルーデキストランとコンカナバリン A との間に出来る沈殿物をワットマン社のガラス繊維ろ紙 (GF-C) を用いてろ過し，ろ液の吸光度をはかり沈殿量を定量することができた。遠心分離では沈殿させることができなかった微細な沈殿物がガラス繊維ろ紙のろ過によってすみやかにのぞかれるので，両者の濃度を変えて最大沈殿量を得る条件をみつけようとしたとき非常に有効であった。

問題点：ろ過面が小さいため沈殿物の量が多いときにはろ過が難かしくなることが欠点であった。この様な時には遠心法と併用すると良いことがわかった。またポリエチレン管がどうしても長くなるので，管の中に水滴がたまりやすく，減圧にしにくい。このためうまく操作出来ないことがあったが，前もってアルコールで洗い，乾かすと問題はなくなった。

以上，実験上の必要にせまられて考案した簡便な多試料ろ過器は細胞収集以外の目的にも容易に作り変え，使えることがわかった。(3) に述べた多試料ろ過装置は抗原-抗体の沈殿物をこし分け結合量を定量するのに有効であろうから，(1) で述べた細胞収集装置とともに免疫学の分野で広く利用しうる装置といえよう。

ろ過面を拡げることにより大容量のものをろ過することが可能であろうが，このろ過器の特長は，一言でいえば，ろ過器の後半分を減圧にすることにより微量のものを簡単にかつ多試料を一度にろ過出来ることにあるのであろう。とはいえ，将来，単試料用ろ過器としても市販されているものにはない自由度のあるものとして利用出来る可能性は大きい。

装置製作にあたり技術上の問題に多くの適切な助言をしていただいた当研究所高橋昭一郎氏に感謝します。

文　献

1) W. I. Waithe and K. Hirschhorn: "Handbook of Experimental Immunology" (Ed. by D. M. Weir) Chapter 25, Blackwell Scientific Publications (1973).
2) A. B. Peck and F. H. Bach: J. Immunol. Methods, **3**, 147 (1973).
3) D. M. Strong, A. A. Ahrmed, G. B. Thurman and K. W. Sell: J. Immunol. Methods, **2**, 279 (1973).
4) R. J. Hartzman, M. L. Bach, F. H. Bach, G. B. Thurman and K. W. Sell: Cell Immunol., **4**, 182 (1972).

5) M. R. Harrison, G. B. Thurman and G. M. Thomas: J. Immunol. Methods, **4**, 11 (1974).
6) C. J. Sanderson and G. A. Taylor: J. Immunol. Methods, **4**, 17 (1974).

A Simple Cell-Harvester with Multiple-Sample Filter Apparatus and Its Applications

Rume SAKAI, Fumiya OBATA and Hiroyuki SHIOKAWA

A cell-harvester with multiple-sample filter apparatus was devised for harvesting cells onto a glass fiber filter strip and washing them. The mechanism of the harvester is the same in its principle as that of automated microculture multiple-sample processor already reported. However, the harvester is handier for usage, much less expensive, and can be made with ease. The device enabled us to establish a new microculture system.

The filter apparatus was composed of 18 gauge needles, punched stainless-steel screens and a part of Falcon Microtest Tissue Culture Plate #3034, and made it possible to filter 6 or more samples at a time. At least 10^6 lymphoid cells per filter hole could be harvested. The apparatus was readily modified to obtain 12 filtrates separately at one operation.