

図2 XPS より算出した修飾界面における原子組成

Content[%]	NVA 10%	NVA 6%	NVA 1%	NVA 0.5%	NVA 0.1%	Nake galss
C 1s	40.9±2.45	49.7±1.26	47.7±1.09	40.7±	37.0±5.13	2.80±0.927
O 1s	54.9±1.75	47.3±1.46	48.8±0.475	54.9±	58.1±4.44	85.9±6.24
N 1s	1.55±0.154	2.12±0.209	2.05±0.212	1.79±	1.89±0.0528	0.476±0.475
P 2s	0.301±0.015	0.757±0.0658	0.713±0.0340	0.636±	0.433±0.0998	0.231±0.177
Si 2s	2.40±0.818	0.0957±0.166	0.770±0.0671	1.95±	2.61±0.633	10.6±5.33
O/C	1.35±0.124	0.951±0.0543	1.02±0.0309	1.37±	1.77±0.263	33.4±12.6
N/C	0.0380±0.00486	0.0426±0.00362	0.0430±0.00530	0.0445±	0.0516±0.00598	0.211±0.262
P/C	0.00738±0.000817	0.0152±0.00150	0.0150±0.000858	0.0159±	0.0134±0.00381	0.0807±0.0485
Si/C	0.0597±0.0240	0.00189±0.00328	0.0163±0.0143	0.0436±	0.0920±0.0203	3.67±0.729
C/O	0.746±0.0677	1.05±0.0582	0.979±0.0291	0.750±	0.666±0.161	0.0332±0.0135
N/O	0.0282±0.00307	0.0449±0.00533	0.0420±0.0043	0.0327±	0.0340±0.00244	0.00550±0.00522
P/O	0.00548±0.000188	0.0160±0.00133	0.0146±0.000578	0.0116±	0.00742±0.00153	0.00279±0.00232
Si/O	0.0436±0.0137	0.00207±0.00358	0.0153±0.0137	0.0351±	0.0417±0.00927	0.127±0.0743

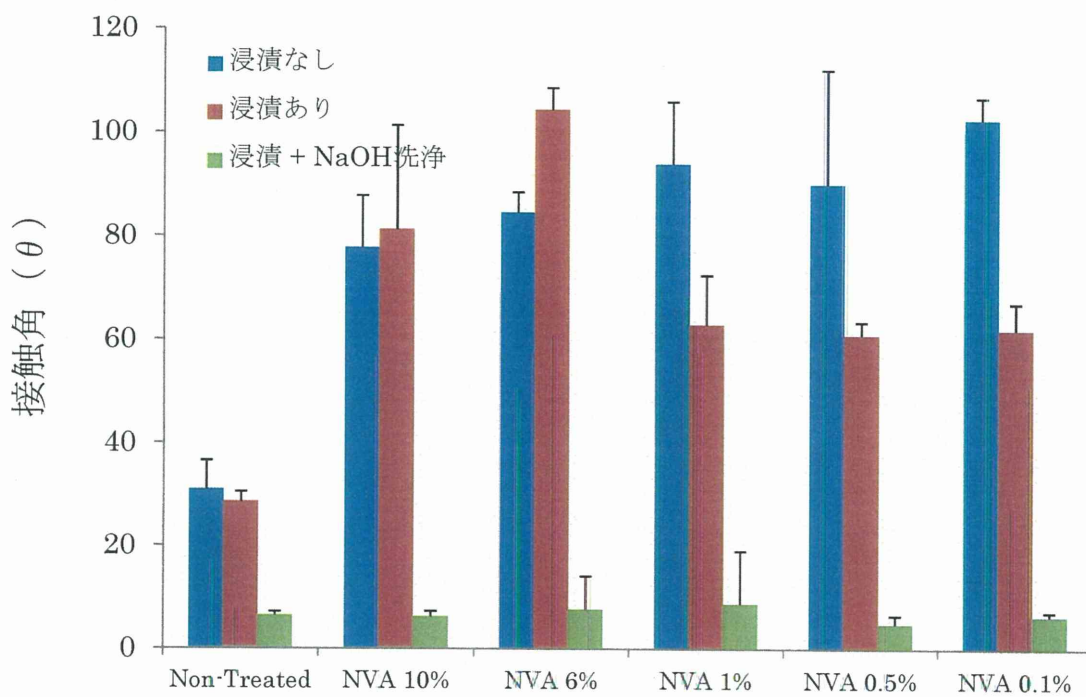
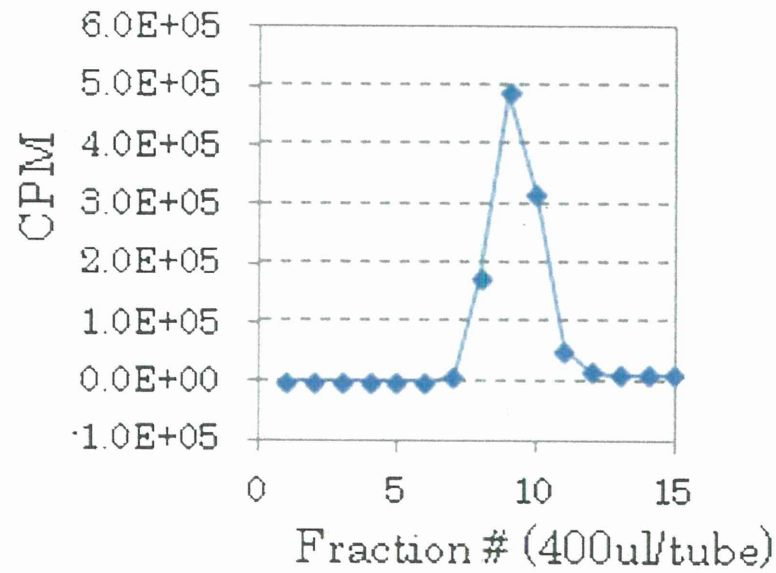


図3 MPC-BMA-NVA 修飾ガラス表面における水接触角測定の結果

(A)



(B)

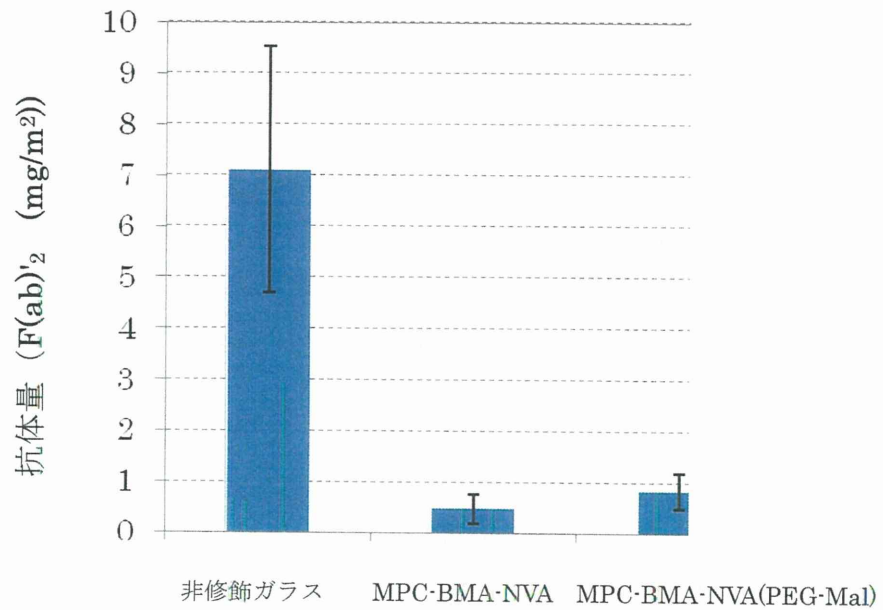
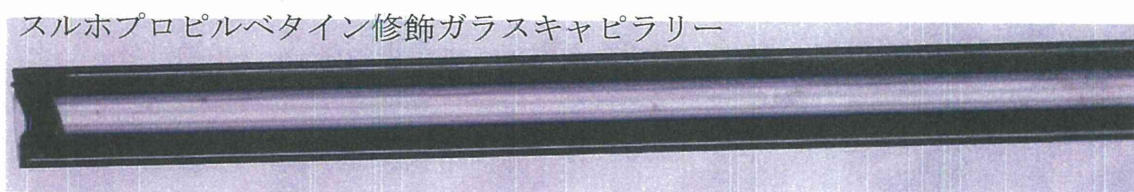
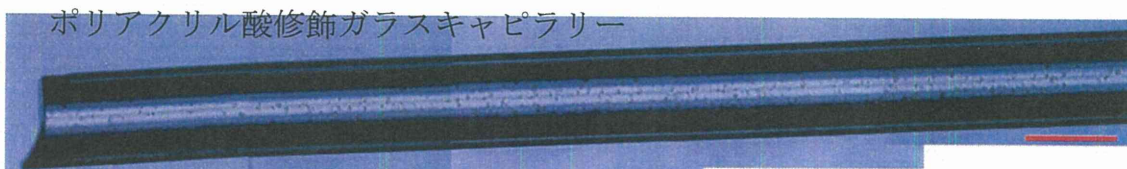


図4 (A) Sephadex G25 カラムにより精製したときの溶出曲線 (B) ガンマカウンターで定量したガラス界面でのタンパク量

(A)



(B)

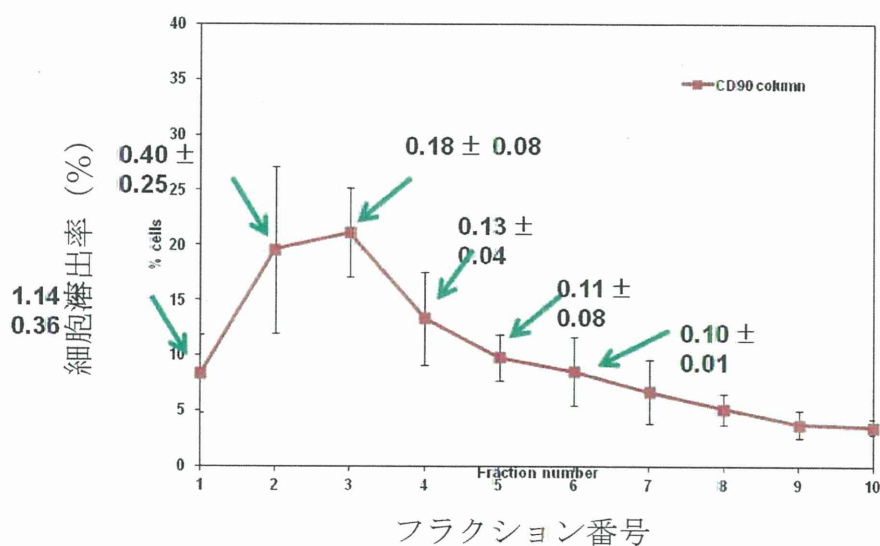


図5 (A) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を流した時のガラスキャピラリー内部の様子 (スケールバー: 1mm) (B) スルホプロピルベタインにより修飾したガラスキャピラリーからの細胞溶出カーブとそれぞれのフラクションにおける細胞ローリング速度 (mm/sec)

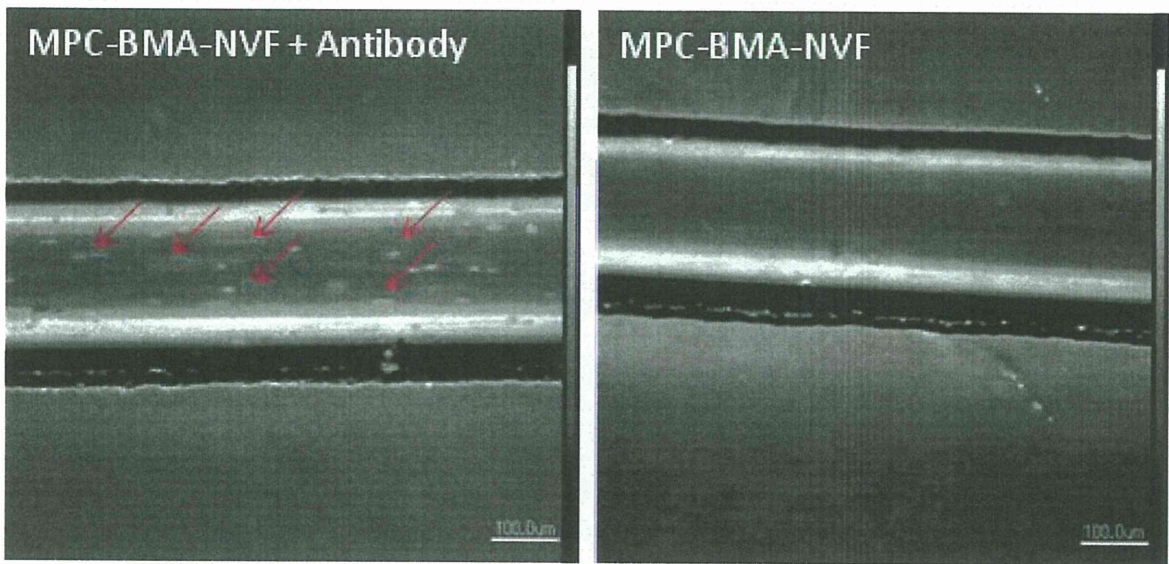


図6 MPC-BMA-NVA 修飾マイクロチャンバー表面における細胞ローリングの様子

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

マイクロ流路の構造設計と細胞ローリングの観察

分担研究者 山岡 哲二

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

研究要旨 細胞ローリングを応用した循環がん細胞検出用のマイクロチップデバイスを構築するためには、固定化リガンドの活性と選択性を保持する界面の分子設計のみならず、検体となる細胞を検出流路へと均一に誘導する機構も重要である。23年度では、スルホプロピルベタインのグラフト鎖を導入したガラス界面の構築と、エッチングならびにフェムト秒レーザー加工装置によるガラス製の交差型マイクロ流路を構築した。

A. 研究目的

循環がん細胞（Circulating tumor cell; CTC）の血中に存在する割合は 10^9 個のうち1～2個程度であることが報告されている。CTCのような希少な細胞を検出するためには、非特異吸着を抑制した環境で、細胞を検出するためのデバイス設計が極めて重要になる。界面におけるリガンド固定化分子の設計は、細胞と界面との特異的な相互作用を誘導するために重要であり、これまでに様々なリガンド固定化分子の作製とその効果について検討してきた。例えば、シランカップリング剤を用いたポリエチレングリコールの導入やアミノ基の導入界面、金蒸着ガラス表面への自己組織化界面が挙げられる。しかしながら、これらの界面はリガンドを高密度で容易に固定化できるという利点を持つ一方で、タンパクや細胞などの非特異吸着

を効率的に抑制することが難しい。そこで着目したのが、ベタイン構造をもつポリマー分子である。ベタイン構造の高分子は、タンパクや血栓の非特異吸着を抑制する効果があり、これまでに脂質イオン基をもつ 2-methacryloyl oxyethyl phosphorylcholine (MPC) に代表されるように、臨床応用においても有効な性能を示すものが開発されている。そこで23年度では、MPC を基礎骨格とした共重合体ならびにスルホプロピルベタインをもつポリマーによるリガンド固定化法について検討した。本分担研究では、ガラス界面からのスルホプロピルベタインポリマーのグラフト重合の検討ならびに、スライドガラス表面に対するエッチング、フェムト秒レーザー加工装置による交差型マイクロ流路を作製し、高感度なマイクロチップデバイスの作製を目指した。

B. 研究方法

1. ガラス界面に対するスルホプロピルベタインのグラフト重合

本実験では、ガラス界面から原子移動ラジカル重合法 (ATRP)により直接スルホプロピルベタインポリマーを重合する手法を検討した (図1)。まず、UV オゾンで洗浄したガラス表面に対して、シランカップリング剤により Br を導入し、そのガラス表面上で、臭化銅 (I)、ビピリジンを追加し、脱酸素条件下で ATRP 反応により重合した。その後、リン酸緩衝液で界面を洗浄した。次いで、活性化エステルを有するビニルモノマーを追加して、重合したスルホプロピルベタインポリマーの末端に導入した。界面での重合反応の確認として、X 線光電子分光法 (XPS) ならびに水接触角測定により評価した。また、コントロールとして、界面においてポリアクリル酸をグラフト化したガラス界面もラジカル重合により作製した。

2. スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製と細胞ローリングの観察

ガラス界面への微小流路の作製方法には、エッチング法とレーザーなどによる掘削法がある。マイクロ流路へ検体となる細胞を安定に導入する機構として、交差した流路を設計した (図4)。このサイズのガラス流路をエッチングにより作製し、新たに購入した加圧式の微小流量コントロールデバイス (Microfluidics Flow Control

System, MFCD 4C-1000) により、流路へ細胞を流してその様子を高速度カメラにより撮影した。

また、z 軸方向への加工精度をもつフェムト秒レーザーを装備した加工装置によりスライドガラスに対して任意のサイズ、形状の流路作成条件について検討を開始した。

C. 研究結果

1. ガラス界面に対するスルホプロピルベタインのグラフト重合

ATRP によりガラス界面にスルホプロピルベタインを導入した後に、XPS により界面の原子組成を評価した。その結果、C1 s ピークの増加ならびに N ピークが検出できた (図2)。さらに、接触角測定では、ポリマーによる修飾により有意に接触角の減少が示された (図3)。これらの結果より、本プロトコルを用いることで、ガラス界面にスルホプロピルベタインのグラフト鎖を導入できることが確認できた。さらに、馬原 淳分担研究者による検討から、界面に対する抗体の非特異吸着能と固定化量をラジオアイソトープにより検討した (図3)。その結果、スルホプロピルベタインポリマーのグラフト鎖を導入することで、抗体の非特異吸着量が有意に減少していることが示された。さらに、活性化エステルを導入すると、抗体固定化量は $3\text{mg}/\text{m}^2$ となり界面全体に抗体を固定化できたことが示された。

2. スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製と細胞ローリングの観察

交差型の流路の一方から、検体となる細胞懸濁液を循環させながら流した。各チャンネルにかかる圧を制御することによって、交差している体積 (12nL) に含まれる細胞懸濁液を細胞ローリング検出用流路へ導入した。その結果、極めて敏速に 12nL の検体を流路へと導入することができた。これにより、1 回の分析に必要な細胞数を一定量分析用の流路へと導入することができる。また、今回作製したマイクロチャンネルは、深さ 150 μm であるが、細胞はチャンネル内を均一に動く様子が高速度カメラで観察された。このサイズのオーダーをもつ流路において細胞ローリングを安定に観察できる可能性が考えられた。今後、チャンネルの深さを変化させ、ローリングに最適な深さを検討する。しかし、分析用流路に流れを変更した場合に、細胞に不均一な圧がかかり、分散する様子も観察されている。各チャンネルにかかる圧力制御も細胞を均一に導入するために必要な要素であることが見出された。

さらに、フェムト秒レーザー加工装置により様々なサイズの流路を掘削する条件の検討も開始している (図 6)。この装置により複雑な形状をもつ流路を自在に成形できるものと考えられる。

D. 考察

スルホプロピルベタインポリマーのガラス界面における合成法の確立とマイクロチップデバイスの設計を中心として研究を進めた。ベタイン構造をもつポリマーは、固定化ガンドの特異性を維持しつつ非特異吸着を抑制できることから、細胞ローリング用のリガンド固定化法として極めて有用であることが見出された。

また、本年度設計した交差型マイクロ流路は、12nL という極めて微量な検体を分析用の流路へと誘導することができた。これは検体を均一に分析する必要がある本装置系においては非常に重要な性能であり、本年度の検討からほぼ確立することができたと考えている。今後、構築したマイクロデバイスに、フェムト秒レーザー加工装置をもちいて作製した流路を導入し、CTC を検出するために必要な流路構造の検索を進める。

E. 結論

マイクロチップの交差型流路は、CTC 検出用のマイクロデバイスにおいて有用である。特に、検体を 12n という極微量を一定量コントロール出来る機構は、マイクロチップ技術において重要である。今後、リガンド固定化界面の作製技術などと融合することで、CTC 細胞を特異的に高効率で検出できるデバイスを作製する。

F. 健康危険情報

現在までのところ、本研究は人間を

対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Yamaoka T., Mahara A., Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells, Reactive & Functional Polymers 2011, 71:362-366.

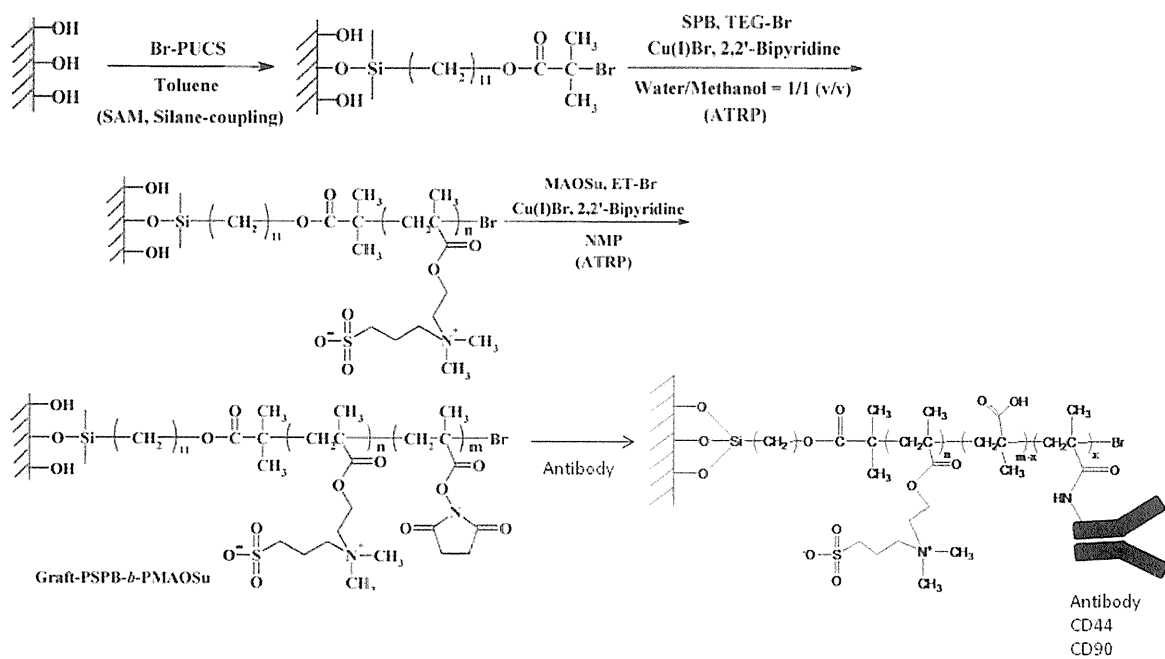
2) Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T., Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogels, ICBS2011, 2011:313-314.

2. 学会発表

1) 山岡哲二, Biomaterials for Stem Cell Transplantation -Cell Purification and Cell Tracking-, 3th Asia Biomaterial Congress (釜山)(2011)[国際学会・口頭発表]

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし

(A)



(B)

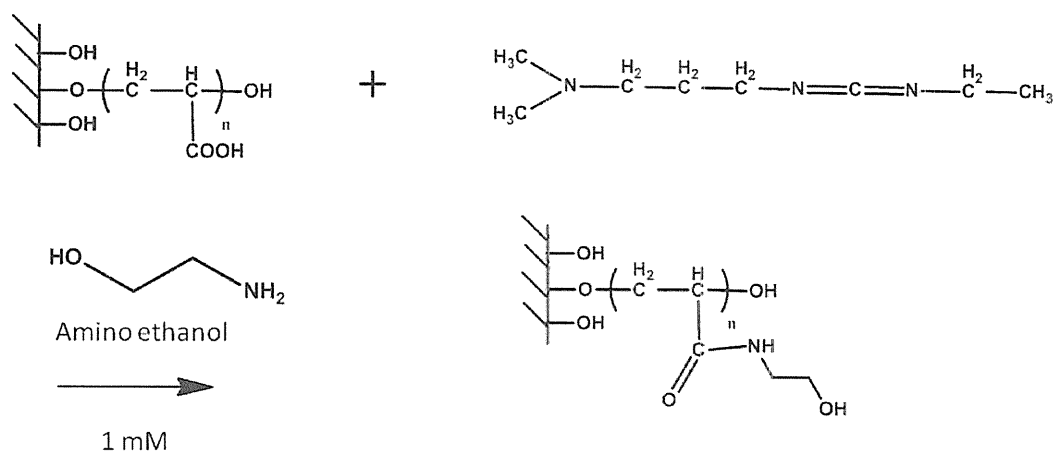


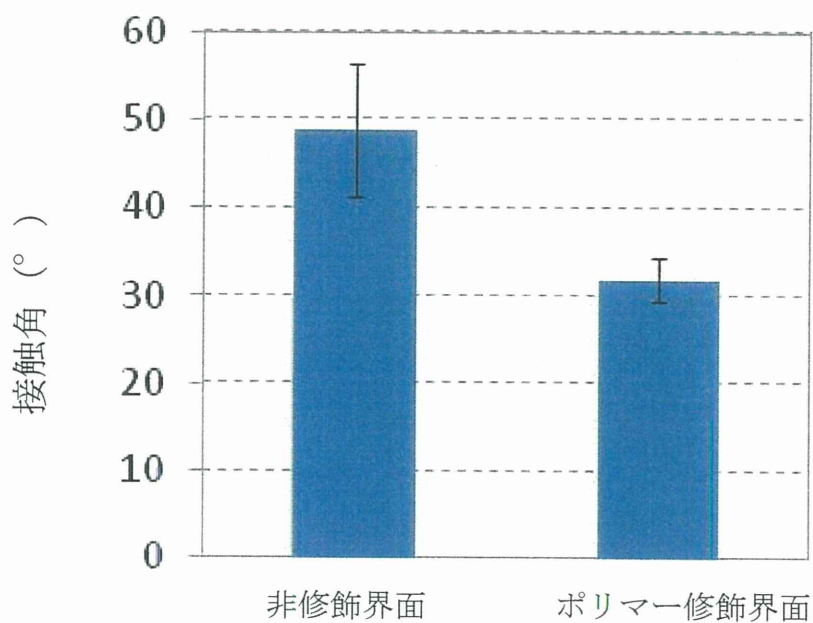
図1 (A)原子移動ラジカル重合によるガラス表面でのスルホプロピルベタインポリマーの合成と抗体固定化反応、(B)ガラス界面に対するポリアクリル酸の重合反応



	Non-mod.	Mod. by SPB	Mod. by CD90
N/C	0	0.088	0.235
Si/C	2.663	0.028	0
S/C	0	0.072	0.061
O/C	27.76	1.133	1.217
Br/C	0	0	0
N/O	0	0.077	0.193
Si/O	0.096	0.025	0
S/O	0	0.063	0.051
C/O	0.36	0.882	0.082
Br/O	0	0	0

図2 XPSによる界面における原子組成を解析した結果

(A)



(B)

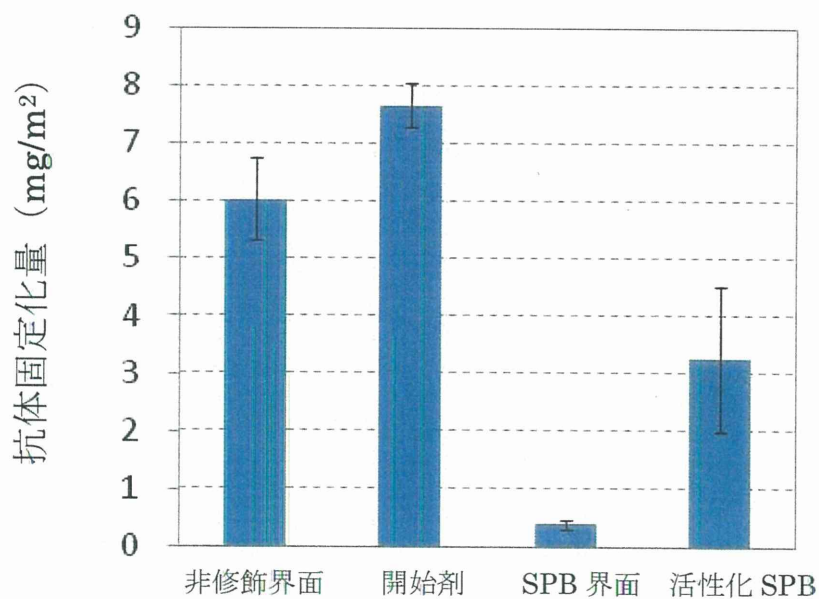


図3 (A) スルホプロピルベタイン (SPB)修飾後の水接触角と (B) ラジオアイソトープによる抗体固定化量の定量結果

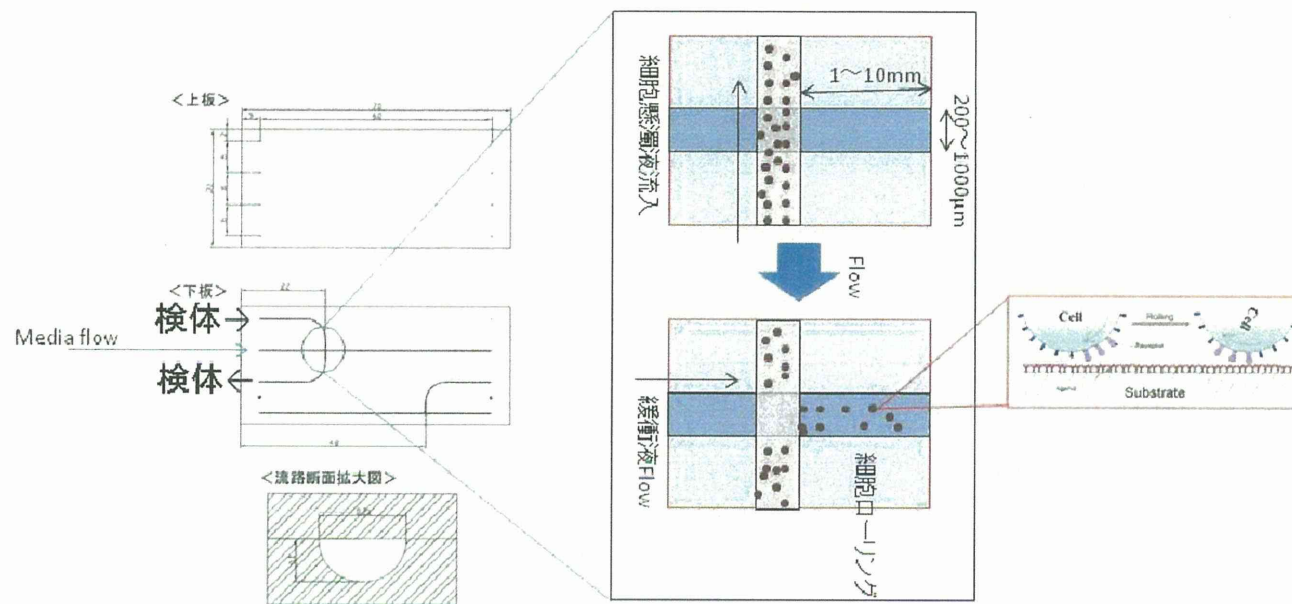


図4 設計した交差型マイクロ流路による細胞ローリング解析用チップ

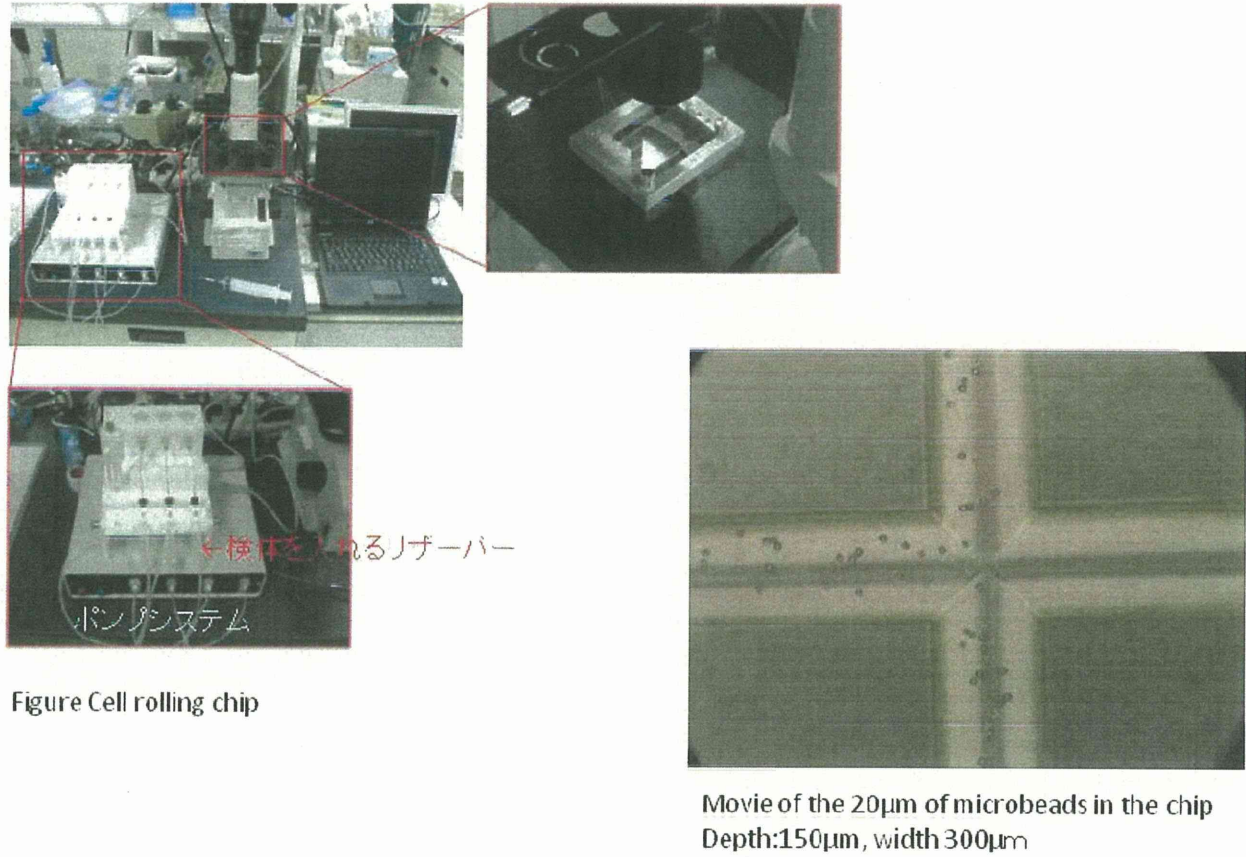


図5 交差型マイクロ流路を設置した細胞ローリング解析用マイクロチップデバイス

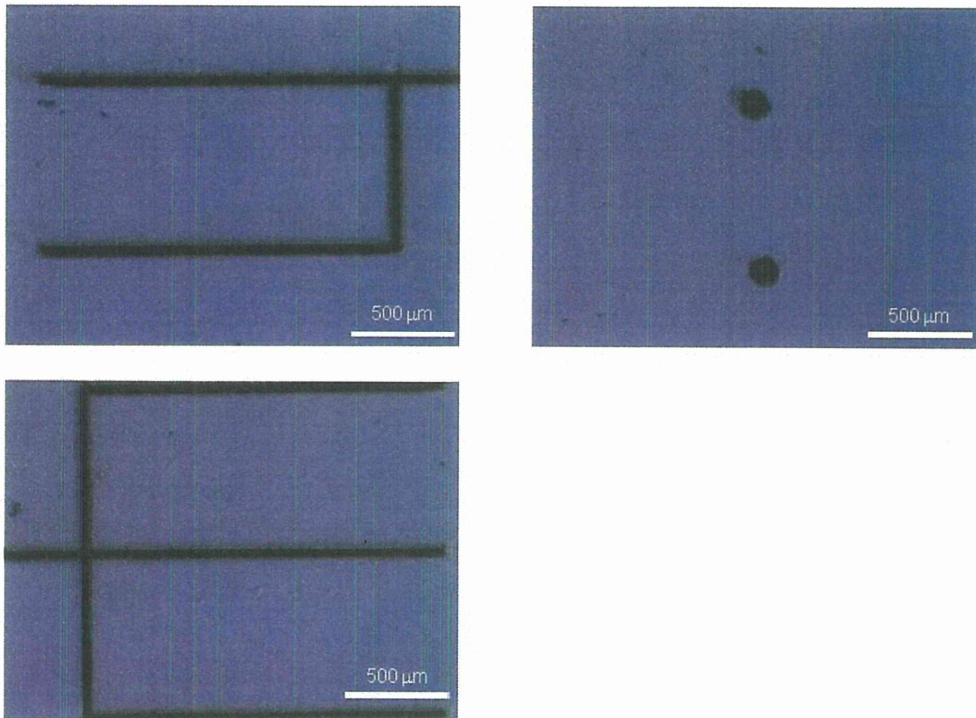


図6 フェムト秒レーザー加工装置を用いたガラス界面に対する加工結果

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山岡哲二 馬原 淳	生体高分子の 界面化学 抗体固定化界面 での細胞ローリングの再現 と幹細胞分離への応用	高分子学会	高分子	高分子学会	東京	2011	P743-744

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Yamaoka T., Mahara A.,	Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells	Reactive & Functional Polymers	71	362-366	2011
Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T.	Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogel	ICBS2011	1	313-314	2011

学会発表

演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
馬原 淳	Novel cell rolling column for stem cell separation	1st International cengress on Advanced Materilas 2011	中国済南	2011/5/13-16
馬原 淳	抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用	第60回 高分子討論会	岡山	2011/9/28-30
馬原 淳	抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発	第33回日本バイオマテリアル学会大会	京都	2011/11/21-22
馬原 淳	Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column	15th International Conference on Thin Films	京都	2011/11/8-11
馬原 淳	細胞分離技術の現状と新展開	第28回医用高分子研究会	東京	2011/11/24
馬原 淳	Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column	第21回日本MRS 学術シンポジウム	横浜	2011/12/19-21
C. Agudero	Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system	Termis-NA 2011	米国	2011/12/11-14
山岡哲二	, Biomaterials for Stem Cell Transplantation -Cell Purification and Cell Tracking-	3th Asia Biomaterial Congress	中国・釜山	2011/9/15-17

特集 バイオポリマーインターフェース—生体分子が拓く新たな高分子界面—

生体高分子の界面化学

抗体固定化界面での細胞ローリングの再現と 幹細胞分離への応用

Stem Cell Rolling and Their Purification on an Antibody-Immobilized Column

Abstract: We have recently developed a novel stem cell separation column on the basis of cell rolling phenomena widely observed in our body. Mouse mesenchymal stem cells are rolling on the anti CD34 (or anti CD90) antibody-immobilized surface at a rolling rate determined by the cell

surface CD34 (CD90) density. With this system, we succeeded to purify stem cells with specific cell differentiation features.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell / Cell Purification / CD34 / CD90 / Cell Differentiation / Cell Rolling

1. はじめに

1980年頃からスキャホールドと体細胞を用いた再生医療が精力的に研究されてきた。その後の幹細胞研究の発展にともなって^{1)~3)}、近年ではスキャホールドを用いない「幹細胞移植療法」が大きな注目を集めている。とくに、患者自らの幹細胞を移植する「自己幹細胞移植療法」の臨床化が進んでいるが、幹細胞の不均一性は治療効果と安全性に大きく影響し、いかに細胞の純度を上げるかがきわめて重要である。本稿では、筆者らが開発を進めている細胞ローリング現象を利用した幹細胞分離カラムについてご紹介させて頂きたい。

2. 幹細胞の純度

再生医療のための有用な幹細胞ソースとしては、(1)間葉系幹細胞(MSC)や造血幹細胞(HSC)など生体内に存在する幹細胞を取り出す、あるいは、(2)ES細胞やiPS細胞から目的細胞を作成する、の二つが考えられる。近年注目されている後者の臨床応用が心待ちにされるころではあるが、倫理的問題あるいは遺伝子操作の安全性に対する課題などまだ時間がかかる。また、分化誘導したとしても目的の分化ステージの細胞だけを単離するのは容易ではなく、混入する細胞によっては重篤な副作用をもたらす危険性も否定できない。一方、前者については、国内で140を超える臨床プロトコルがオープンになり、平成22年11月に改訂されたヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する

指針では、自己幹細胞移植への配慮も盛り込まれ、その実用化に対する制度的支援も着々と進んでいる。

たとえば、ヒト骨髄細胞をシャーレに播種して接着した細胞を骨髄MSCとして用いられることが多いが、ここに多くの細胞が混在していることは明らかである。幹細胞は、細胞表面に特有の「表面抗原分子(表面マーカー分子)」をもっているため、これに対するモノクローナル抗体の結合で細胞を同定することができる。このモノクローナル抗体の国際分類(CD, Cluster of differentiation)を用いて細胞の特性を表記する。たとえば、ヒトHSCはCD34陽性であるが、CD34陽性細胞がヒトHSCというわけではなく、さらに詳細に細胞を同定するための表面マーカー分子の検討が続いている。細胞の純化にもこの表面マーカー分子が利用されている^{4),5)}。Fluorescence activated cell sorting (FACS)法は、特定の細胞表面マーカーに対して蛍光標識抗体を結合させることで目的細胞を識別して電場によりソーティングする。一方、近年急速に普及してきMagnetic activate cell sorting (MACS)法では、抗体修飾磁気ビーズにより認識された細胞を磁場によりトラップして特定の細胞ポピュレーションを分離する。装置が簡便で大量の細胞を一度に処理できる。両手法の最大の弱点は、単離した幹細胞が、蛍光修飾抗体や磁性微粒子修飾抗体と結合したままであることである。このような背景から、筆者らは、表面分子マーカー発現の「程度」、すなわち、表面マーカー分子の細胞表面での密度を連続的に分離することができ、かつ、抗体などの混入がない「細胞ローリングカラム」の開発を始めた。



山岡 哲二 Tetsuji YAMAOKA

国立循環器病研究センター研究所・
生体医工学部
[565-8565] 吹田市藤白台5-7-1
部長、博士(工学)。
専門はバイオマテリアル、再生医工学。

(写真左)

馬原 淳 Atsushi MAHARA

同左

研究員、博士(学術)。
専門は細胞工学、機能性高分子。

(写真右)

3. 細胞ローリング現象と幹細胞分離

細胞が固相界面上で転がる(ローリングする)現象は、血管内を流れる白血球が炎症部位付近の血管内腔面に集積する際の白血球ローリング現象として知られている⁶⁾。炎症部位の血管の内腔にセレクトリンと呼ばれる白血球表面糖鎖と結合できる分子が多く現れ、白血球はこのセレクトリンと相互作用して血管の内腔表面を転がって炎症部位にたどりつく^{7),8)}。この細胞ローリングを人工的に再現することも可能で⁹⁾、筆者らは、この関係を逆転させることで幹細胞分離カラムを開発しようと考えた。すなわち、幹細胞表面マーカーであるCD34に対する抗体を均一に固定化した界面上で幹細胞をローリングさせる(図1)。細胞ローリング速度の定量的な解析は、Hammerらのグループを中心に詳細に報告されており、速度はリガンドとレセプターとの相互作用点の数(密度)によって規定されることが報告されている¹⁰⁾。すなわち、細胞ローリングカラムに注入された幹細胞のうちCD34密度が低い細胞が早く溶出し、高い細胞は遅れて溶出して来るはずであり、溶出時間によって目的のCD34密度(発現)の幹細胞を単離できる。この手法の利点は、表面マーカーの発現密度により細胞

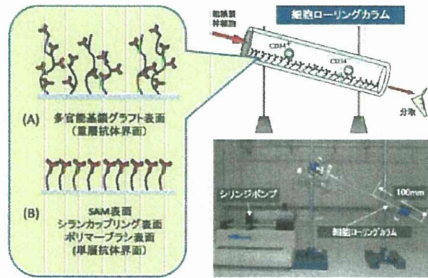


図1 細胞ローリングを模倣した新たな幹細胞分離カラム

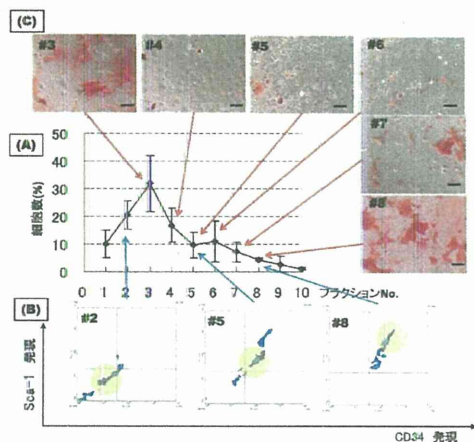


図2 CD34固定化細胞ローリングカラムでの(A) MSC分離パターンと、各フラクション中の細胞の(B)細胞表面マーカー特性、および(C)骨芽細胞分化能

を分離できることのみならず、分離された幹細胞に抗体などの混入がないことである。さらに、複数の抗体やリガンドをカラムに固定化することでさまざまな表面マーカーパターンに基づく分離が達成できる。

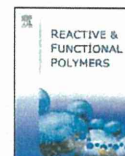
この分離システムの有効性を評価するため、マウス骨髄細胞から培養皿へ接着する細胞分画を採取して「粗MSC」とし、CD34抗体を固定化した細胞ローリングカラムにより分離したときの細胞溶出パターンを図2Aに示した^{11),12)}。抗体を固定化していないコントロールカラムの場合、細胞はフラクション#2-3付近ですべて溶出するのに対して、CD34抗体固定化カラムを用いた場合は溶出時間の遅延が確認され、2ピークが確認できる。また、それぞれの、フラクションに存在する細胞の表面マーカー(CD34とSca-1)をFACSにて定量したところ、溶出時間とともにCD34発現密度が上昇しており、上述の細胞分離機構が機能していることが確認された(図2B)。さらに、それぞれの細胞に常法により骨芽細胞への分化を誘導し、所定時間後に染色法により骨芽細胞への分化効率を検討した結果を図2Cに示した。フラクション#4~6の細胞の骨分化能が低く、CD34発現の非常に低い画分(#3)と非常に高い画分(#7-8)が赤く染まり骨芽細胞に分化する能力が高いことがわかる。これらの二つのポピュレーションは分化ステージの異なるものであると考えられ、幹細胞分離において、特定の細胞表面マーカー密度をもつ細胞核分を単離することの有用性を示しており、細胞ローリングカラムにより、従来困難であった幹細胞純化が達成されたと考えている。

4. おわりに

今後、幹細胞を利用した医療が急速に拡大することは疑う余地がない。上述の細胞ローリングカラムもまだ多くの課題を抱えており、細胞の非特異的吸着を抑制するために抗体の単層固定化技術を導入するなど、さらなる改良を進めているところである(図1B)。細胞工学的手法や分生学的技術の急速な進歩に遅れることなく、細胞純化・細胞送達・3D組織構築など、材料科学により解決されるべき課題を一つずつ解決して行かなくてはならない。

文献

- 1) J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones, *Science*, **282**, 1145 (1998)
- 2) M. F. Pittenger, *et al.*, *Science*, **284**, 143 (1999)
- 3) K. Takahashi, *Cell*, **131**, 861 (2007)
- 4) R. S. Moulday, *et al.*, *Nature*, **268**, 437 (1977)
- 5) P. L. Kronick, *et al.*, *Science*, **200**, 1074 (1978)
- 6) H. Ulrich, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 7538 (1991)
- 7) M. R. King, *et al.*, *Biophys. J.*, **81**, 799 (2001)
- 8) D. A. Hammer, *et al.*, *Biophys. J.*, **52**, 475 (1987)
- 9) M. B. Lawrence and T. A. Springer, *Cell*, **65**, 859 (1991)
- 10) D. A. Hammer, *et al.*, *Biophys. J.*, **63**, 35 (1992)
- 11) A. Mahara and T. Yamaoka, *Biotechnol. Prog.*, **26**, 441 (2010)
- 12) A. Mahara and T. Yamaoka, *Biomaterials*, **31**, 4231 (2010)



Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells

Tetsuji Yamaoka*, Atsushi Mahara

Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 8 December 2010

Keywords:
Stem cell separation
Cell rolling
Surface marker
Antibody
CD34

ABSTRACT

Various types of stem cell have been studied as potential cell sources in regenerative medicine. In particular, the autologous stem cells such as mesenchymal stem cells are being widely examined because they can be easily harvested from the patient. For regenerative medicine to become a safe and common practice, stem cells that exist together with various other kinds of cells in the organs must be isolated and purified without any loss of cell functions such as cytokine production or cell differentiation ability. Here, we briefly review the cell separation methods and introduce our original cell separation method based on the cell rolling phenomenon. Mesenchymal stem cells (MSCs) were conventionally isolated by using the adherent property of bone marrow cells onto a plastic culture dish, but they were considered as phenotypically and functionally heterogeneous. We developed a ligand-immobilized surface for separating a subpopulation of adherent cells derived from bone marrow and successfully isolated two cell populations with high differentiation ability for osteoblasts.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Regenerative medicine is the process of reproducing the lost function of the tissue/organs due to age, disease, damage, or congenital defects by artificially using the intrinsic healing capacity of living organs or cells with a controlled appropriate microenvironment for the stem cells. Regenerative medicine presents potentially attractive alternatives to the use of artificial organs or organ transplantation. Recently, autologous cell transplantation has been widely carried out clinically because of the safety of the procedure. As the cell source, autologous stem cells such as mesenchymal stem cells have been widely examined because they can be easily harvested from the patient. For regenerative medicine to become a safe and common practice, stem cells that exist together with various other kinds of cells in the organs must be isolated and purified without any loss of cell functions such as cytokine production or cell differentiation ability. In the case of embryonic stem (ES) cells and the induced pluripotent stem (iPS) cells, which recently have been receiving increasing interest, it is possible to get a sufficient number of cells from a single cell colony. However, since various cell types or stages appear during the cell differentiation procedure, it is necessary to check the individual cell features and to prepare as uniform a cell population as possible. The development of an effective and safe cell isolation system is thus very important for improving regenerative medicine. In the present study, we focused

on the separation methods of stem cells, and we describe our recent results in using a cell rolling column for stem cell separation.

2. Stem cells in regenerative medicine

Rapid advancements in stem-cell research have greatly affected regenerative medicine and cell transplant therapy. Human ES cell establishment by Thomson in 1998 [1], information about the separation and differentiation capacity of mesenchymal stem cells (MSCs) reported by Pittenger in 1999 [2], the report on the plasticity of MSCs by Verfaillie in 2002 [3], and the establishment of induced pluripotent stem cells (iPS) by Yamanaka in 2007 [4] greatly increased the possibility of cell sources for use in regenerative medicine. However, using these kinds of stem cells for regenerative medicine as a common strategy in clinical stage will require more research. Homogeneity of the cell type and differentiation stage and protection from infectious issue must be taken into consideration, for the safe and effective practice of regenerative medicine. Scheme 1 shows some of the stem cell sources. Among these cells, autologous transplantation of MSCs derived from bone marrow or adipose tissue has been carried out clinically, due to the lower risks of this procedure and the easier isolation of MSCs.

2.1. Embryonic stem cells (ES cells)

Thomson et al. reported the establishment of human ES cells in 1998 [1]. ES cells were derived from the inner cell mass of blastocysts; they are known to differentiate into nerve cells [5], blood cells [6], cardiomyocytes [7,8], and other cells. The pluripotency

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6833 5012x2637; fax: +81 6 6835 5476.
E-mail address: yamtet@ri.ncvc.go.jp (T. Yamaoka).