

Biomek による細胞培養の自動化

— マウス ES 細胞の安定的な維持培養 —



細胞の維持培養の標準化を実現する 自動化ソリューション

Abstract

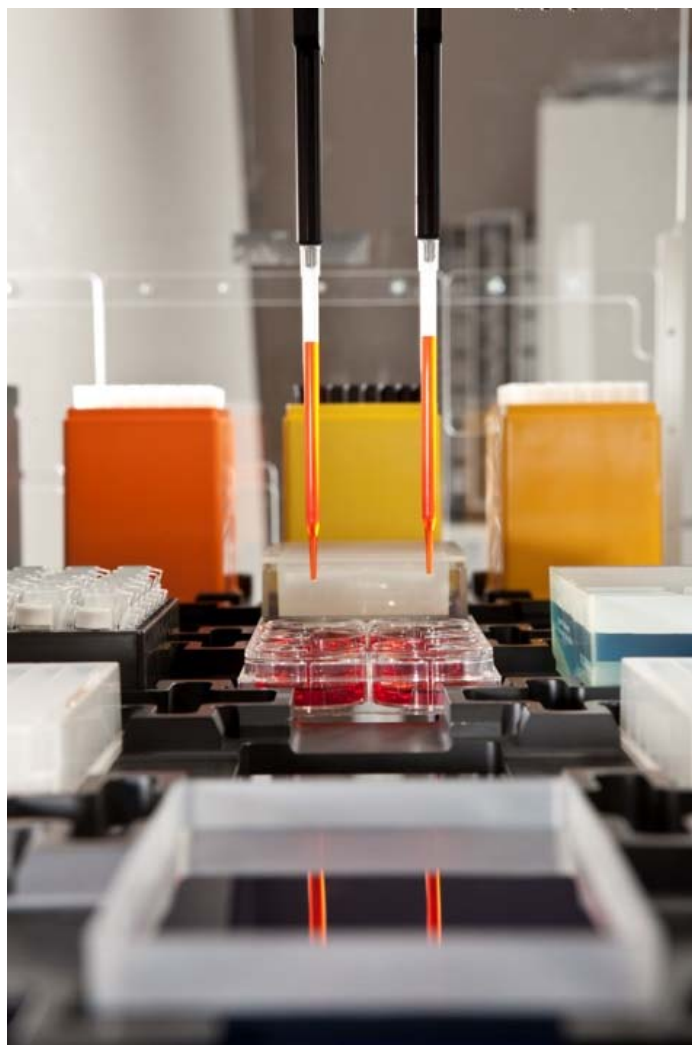
細胞培養は、生物学の基礎研究、創薬のいずれにおいても不可欠な側面です。近年、細胞培養の複雑化やサンプル数の増大に伴い、自動化の必要性が高まっています。本アプリケーションノートでは、細胞株維持の標準的なワークフローの自動化について、マウス ES 細胞を用いて自動化のプロセスを示しています。細胞培養の培地交換および継代を自動化することで、日々の操作時間が大幅に削減され、実験者間での細胞のばらつきが取り除かれます。

Introduction

培養細胞は多くの科学的発見において極めて重要な役割を果たしており、細胞アッセイのコストや煩雑さが動物試験に比べて極めて低いことから、創薬における培養細胞の使用は増加し続けています。これらの実験に不可欠な細胞培養技術には重要な価値があるため、細胞維持に要される手動操作には膨大な時間がかけられてきました。短期または長期のいずれのアッセイにおいても、細胞培養は日々行う作業であることが多く、研究室で使用される細胞株数の増加に伴い、作業量も増大しています。大部分の細胞培養操作には、培地交換、接着細胞のトリプシン処理、およびこれらの細胞の新しい容器への継代など、無菌作業があります。さらに、細胞の状態を確認するための細胞の生存率および細胞濃度のモニターは、定期的および継代を行う時点で行われ、一定の細胞数に揃えてアッセイに使用されなければなりません。細胞株の維持に含まれる標準的なステップには、細胞の播種、培地交換、継代および増殖が含まれ、細胞が遺伝子操作またはアッセイに使用される前に最適化されていなければなりません。

以下のセクションでは、細胞維持培養の自動化により、研究者がこれらにかかる時間を削減することが可能なことを示します。もちろん、これらの時間削減の可能性も、細胞維持の品質が自動化と手動操作で同等もしくはそれを超えるものでない限り価値がありません。操

作における各ステップを最適化することにより、ユーザー間のばらつきを取り除き、細胞維持および細胞アッセイの均一性を向上させることが可能です。ここでは、マウス胚幹細胞 (mES 細胞) の培養を行い、細胞維持の自動化の実現可能性を示します。本アプリケーションノートにおける mES 細胞培養系は、抗生物質の非存在下でも滅菌性が維持され、10 回の連続継代において 90% を超える細胞の生存率および未分化率が維持されました¹。



自動化ソリューション

細胞維持培養における培地などの液体の分注を行うステップはすべて、Biomek を使用して自動化が可能であり、さらに周辺装置を統合することによりワークフロー全体を自動化することができます。バックマン・コールターは、細胞培養のステップの自動化を可能にする多数の自動分注機をご提供しています。Biomek 4000 は、標準的なクリーンブース内や安全キャビネットに設置することができるため、簡単に細胞自動化ソリューションを実現可能です。Biomek NX^P および Biomek FX^P においても、専用の HEPA フィルター付エンクロージャー内で使用できるため、細胞操作環境の滅菌性を確保することができます。分注操作の無菌性については、滅菌または滅菌フィルター付きピペットチップを使用することによっても維持されます。自動化された分注ステップは、手動操作を模倣するようにデザインされ、例えばチルトリング装置を使用し、培地を除去するためにプレートを傾けることなども可能です。

Biomek の細胞培養システムとしての可能性をさらに広げるために、細胞培養工程で用いられるその他の装置を自由に統合することもできます。CO₂ インキュベーターおよびマイクロプレートホテルなどの装置と接続し、より高いスループット、より長期間にわたるアプリケーションの自動化を実現します。また、Vi-CELL XR 生死細胞オートアナライザーを接続させることにより細胞数および細胞生存率を自動的に測定することができます。さらに、プレートリーダーやセルイメージャーなどの測定装置を接続することにより、培養細胞のモニターまたは培養した細胞を用いたアッセイにおけるデータ取得も可能となります。Fig. 1

には、本アプリケーションノートにて mES 細胞維持培養の自動化に使用した統合システム(インテグレーションシステム)を示しました。これらのシステムで使用される複数の培養プレートや測定データについては SAMI EX Workstation ソフトウェアにより制御することができます。さらに、SAMI Process Management Software を用いることにより、複数日または複数週のアッセイのスケジュールを組み立てることも可能です。

単体での自動分注機またはインテグレーションシステムのいずれを使用しても、細胞維持およびセルベースアッセイを自動化することにより、これらの操作に費やされる時間が大幅に削減されると同時に、複数の異なるユーザーがこれらの操作を実行する際に伴うばらつきが排除されます。

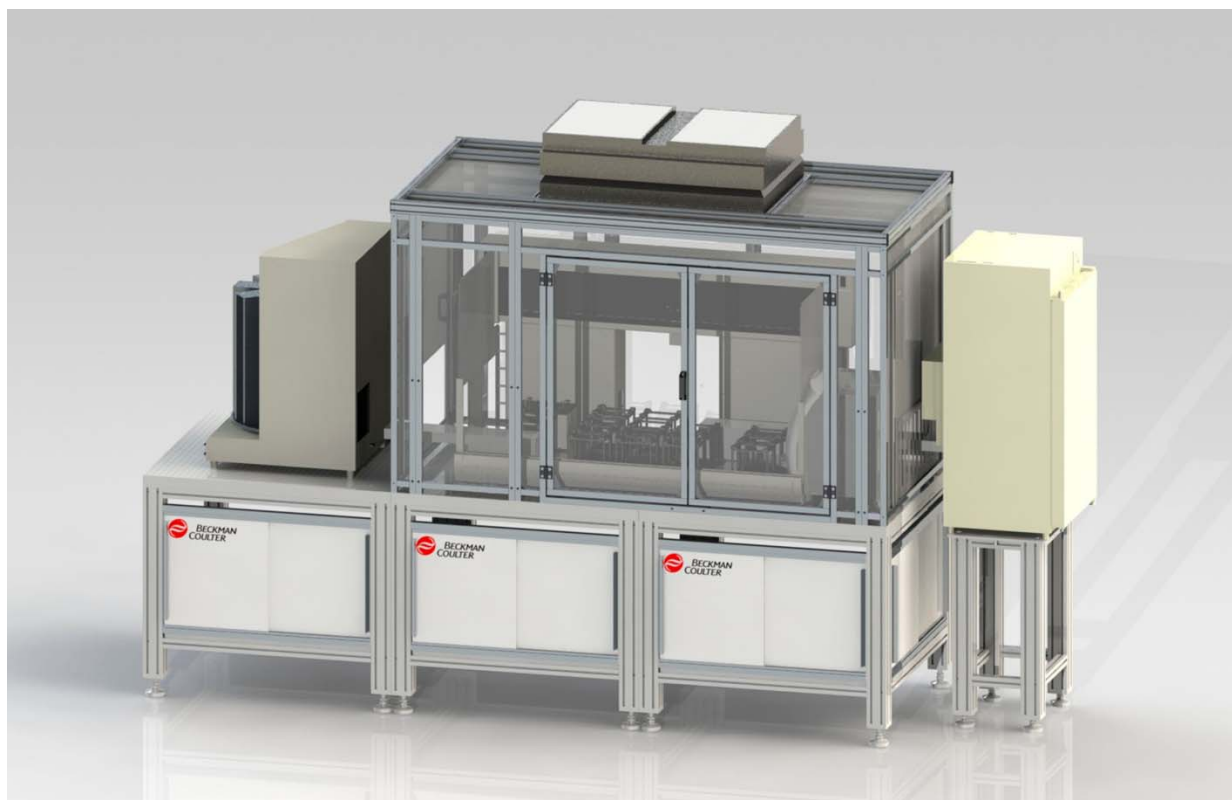


Fig. 1 mES 細胞の培養に使用したインテグレーションシステム

Materials and Methods

マウス胚幹細胞 (129 系) を、Biomek FX^P を含むインテグレーションシステムにおいて、6 ウェルプレートを用いて維持培養を行いました。プレートのウェルは 1% (v/v) gelatin を用いてコートし、培地には KnockOut DMEM に 15% (v/v) KnockOut Serum Replacement、glutamine、NEAA、1000 U/ml ESGRO を添加したものを使用しました。細胞は Biomek FX^P で 2~3 日毎に継代し、継代を行わない日には培地交換を行いました。継代は、細胞を PBS で洗浄したのちにトリプシン処理し、Vi-CELL XR により細胞数をカウントした結果に基づいて 8×10^5 の細胞となるよう必要な容量を新しいプレートに分注することにより実施しました。各継代後に、未分化マーカーとして SSEA-1 の染色を手動操作により行いフローサイトメーターによる解析を行いました²。Fig. 2 は、これらの細胞の継代に使用した SAMI EX Workstation ソフトウェアのメソッド(プログラム)を示しています。

維持培養の評価

連続した 10 回の自動および手動による継代で、細胞の生存率および未分化率を測定した結果、自動化での細胞培養では、90%を超える生存率 (Fig. 3a) および 90%を超える未分化率 (Fig. 3b) が保たれ、手動操作により培養された細胞と同等の結果が示されました。さらに、培養の無菌性は、培地中に抗生物質が存在しない状態でも、10 回の継代すべてにおいて維持され、エンクロージャーおよび滅菌チップが汚染を防ぐために十分な機能を持つことがわかりました。これらの結果から、感受性の高い mES 細胞でも、手動操作と同等の品質で自動化システム上で維持できることが示されました。

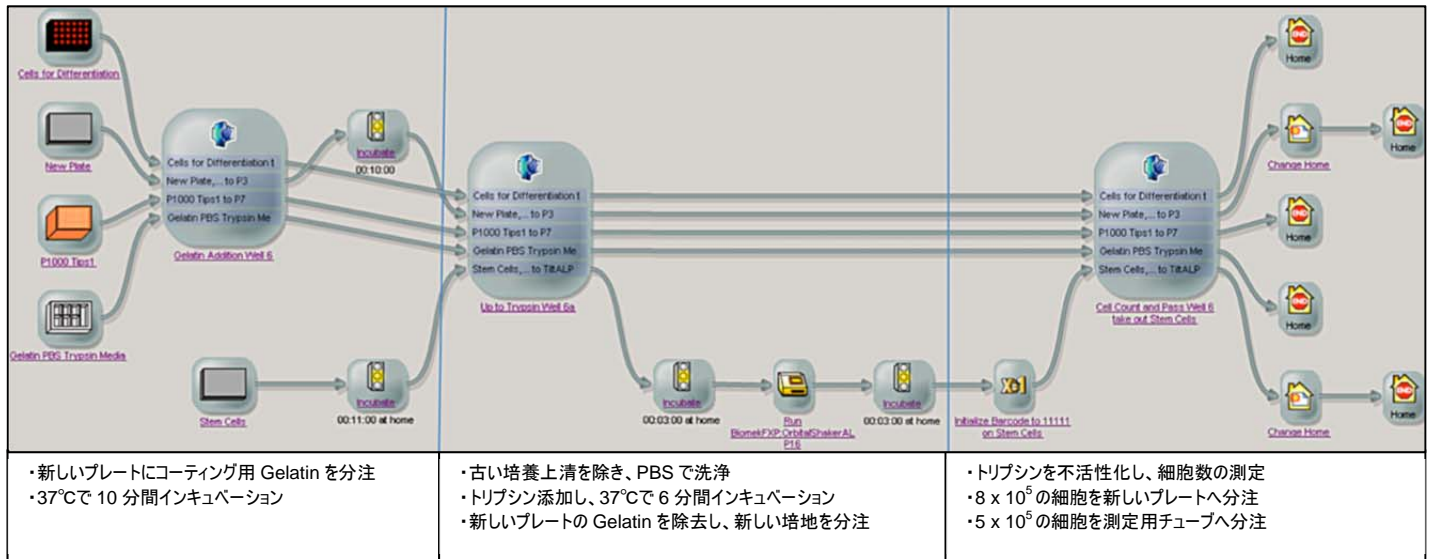


Fig. 2 細胞継代用の SAMI EX Workstation ソフトウェアのメソッド

SAMI EX Workstation ソフトウェアは、Biomek FX^P と統合した周辺装置 (Cytomat 2C インキュベーター、Cytomat Hotel、Vi-CELL XR) の制御を行うとともに、実験のためのプロトコルの作成を行うことが可能です。Vi-CELL XR で測定された細胞数データはトラッキングされ、継代に使用する容量を自動的に判断させることが可能です。継代と同時に、未分化率解析用のフローサイトメーター測定用チューブへの分注も行います。

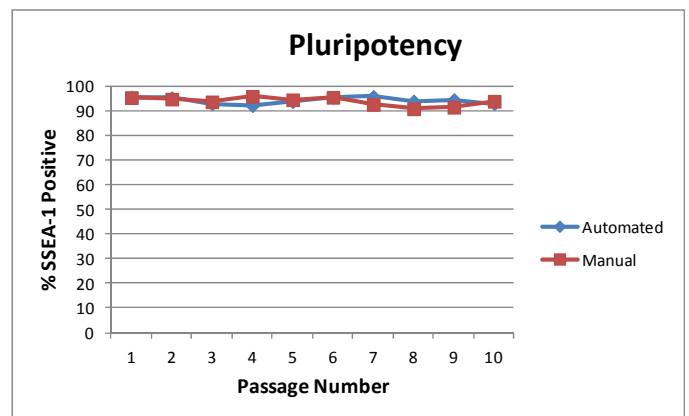
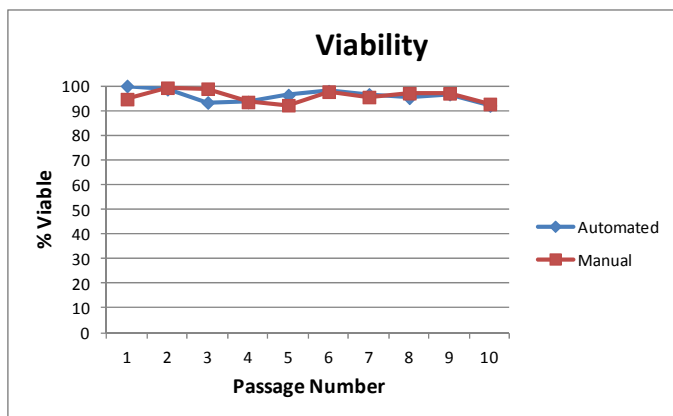


Fig. 3 自動化した場合と手動操作での比較

- Vi-CELL XR 生死細胞オートアナライザーによる生細胞の割合の測定結果。細胞は 90%以上の生存率で自動化した場合 (Automated) と手動操作の場合 (Manual) で顕著な違いは見られなかった (Automated Mean = $96.0 \pm 2.5\%$, Manual Mean = $95.9 \pm 2.5\%$, $p = 0.88$)。
- 培養した mES 細胞の未分化率。フローサイトメーターによる SSEA-1 陽性細胞の割合の測定結果。細胞は 90%以上の未分化率で自動化した場合 (Automated) と手動操作の場合 (Manual) で顕著な違いは見られなかった (Automated Mean = $94.2 \pm 1.4\%$, Manual Mean = $93.8 \pm 1.7\%$, $p = 0.56$)。

Conclusion

細胞培養の基本的なステップを自動化する方法を示し、これらの工程の自動化が実現可能であることを、mES 細胞の 10 回にわたる継代培養により示しました。感受性の高い mES 細胞の維持培養を手動操作と顕著な差なく実現できることから、その他の多くの細胞にも適用可能と考えられます。さらに、CO₂ インキュベーター、遠心機、またはフローサイトメーターなどの装置を接続させ、培養から測定までのワークフローの全工程を自動化することも可能です。このようなプロセスの自動化で、実験者間の差を最小限にしたロバストな結果が得られ、さらに研究者の細胞株の維持およびアッセイ準備のために費やす時間を大幅に削減することで、実験デザインおよび結果の解析に集中することをサポートします。

Authors

Michael Kowalski, Staff Applications Scientist, Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN

References

1. Kowalski M P, Yoder A, Liu L and Pajak L. Controlling embryonic stem cell growth and differentiation by automation: enhanced and more reliable differentiation for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* 17(9); 1171-9; (Oct 2012).
2. Solter, D, Knowles B B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(11); 5565-9; (1978).



ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 [URL http://www.beckmancoulter.co.jp/](http://www.beckmancoulter.co.jp/)