



フローサイトメーターによる細胞解析の完全自動化

Fully-Automated Cellular Analysis by Flow Cytometry

Summary

- CytoFLEXフローサイトメーターをBiomek i-Seriesへ直接接続することで、サンプル調製からデータ取得までの完全自動化を実現しました。
 - CytoFLEXはコンパクトでありながら、最大15パラメーターを取得可能な高感度なハイパフォーマンス コンパクトフローサイトメーターです。
- 自動プレート調製、薬剤処理、トリプシン処理、細胞染色によるアポトーシスと細胞毒性の解析を行いました。
 - セレクティブチップピペティングによって、マルチチャンネルヘッドにおいても段階希釈系列の作製と経時解析用にプレートへの部分分注が可能になりました。
- 接着性細胞と浮遊性細胞について、複数の化合物に対する濃度依存性と時間依存的な応答を解析しました。

フローサイトメーターは、多様な状態の細胞群を単一細胞レベルで解析する強力なツールとして広く利用されています。しかしながら、単一細胞へ分離するためには接着性細胞のトリプシン処理や染色試薬の除去のための遠心分離といった煩雑な作業が必要となります。これらの工程を自動化することにより、ベンチワークの時間を減らすことができ、トリプシン処理などのサンプル調製時間をサンプル間で均一にできることから実験の再現性の向上が期待できます。さらに、プレート単位での処理によってスループットの向上を図ることができます。

そこで本アプリケーションノートでは、Biomek i7 自動分注ワークステーション (Figure 1A) による細胞解析工程の完全自動化について、2種のがん細胞株に対するアポトーシス誘導とその解析の実施例を示します。まず細胞の調製はHEPAフィルター付のエンクロージャータイプのBiomekを用い、無菌状態下で行いました。特にBiomek i-Seriesは外部の機器と簡単かつダイレクトに接続できるため、今回用いたCytoFLEXフローサイトメーターのようなプレートローダーを搭載した機器であれば、搬送用ロボットを介さずに接続することができます (Figure 1B)。

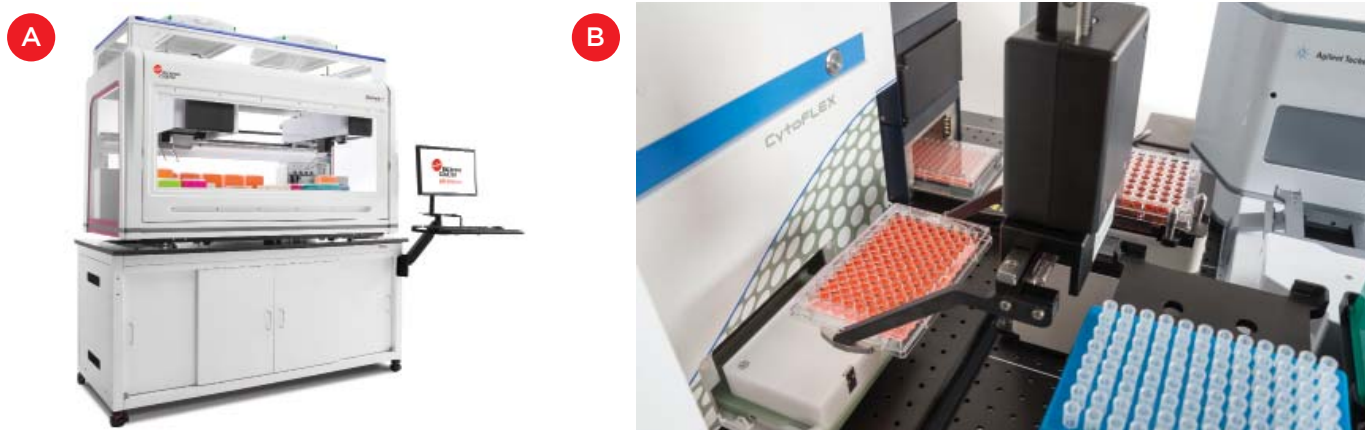


Figure 1. HEPAフィルター搭載型のBiomek i7 自動分注ワークステーション (A) と接続されたCytoFLEXフローサイトメーターのプレートローダーへのアクセス (B)

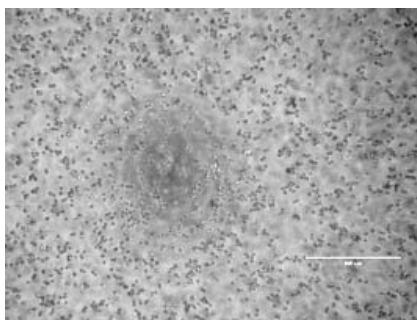


Figure 2. 自動化装置によるトリプシン処理と再懸濁を行ったHCT116細胞

本実験では、浮遊性細胞であるヒト白血病由来 Jurkat 細胞と接着性細胞の大腸がん由来 HCT116 をモデル細胞として選択しました。いずれの細胞株においても、25,000 細胞ずつ 96-well プレートに播種しました。また、マルチチャンネルヘッドのセレクティブチップ機能を使ってスタウロスポリン、カンプトテシン、5-フルオロウラシルの3種の化合物について段階希釈液を作製しました。これらのアポトーシス誘導剤を播種後 24 時間培養後に細胞に添加した後、24 から 72 時間インキュベートしました。染色に先立ち、HCT116 細胞に対してはデッキ内のペルチェ温度調節デバイス上でトリプシン処理を行い、マルチチャンネルヘッドでのピペティングを繰り返すことにより、単一細胞の懸濁液を調製しました (Figure 2)。これらの細胞に対し、アポトーシスが亢進している細胞を同定する CellEvent Caspase-3/7 Green (Life Technologies 社) および透過性の細胞膜をもつ細胞を死細胞として染色する DRAQ7 (ベックマン・コールター社) で染色しました。

細胞は前方および側方散乱光とともに、アポトーシスと細胞死をそれぞれFITCとPC5.5のチャンネルで検出することで同定しました。Analysis plotはKaluzia 1.5ソフトウェアで作成しました。3段階の濃度の5-フルオロウラシルをそれぞれ添加後48時間インキュベーションした際の、細胞の生存率とアポトーシスの程度をFigure 3Aにて示します。またFigure 3Bにて、48時間後の濃度応答性曲線とIC50の算出結果を示します。これらの結果から、Biomek i-Series自動分注ワークステーションによって調製した薬剤の段階希釈液が想定どおり作用したことが示されました。Figure 4Aは、78 nMカンプトテシンで処理したJurkat細胞について細胞死パスイの亢進の程度を経時的に示しています。あわせてそれぞれの状態の細胞における存在率の遷移をFigure 4Bに示します。これらの結果から、マルチチャンネルのセレクトティブチップ機能を使うことによって、細胞のプレートへの一括播種、反復実験用のプレートへの段階希釈薬剤の添加、実験群単位での細胞の回収といった煩雑な実験操作を簡素化できることが実証されました。

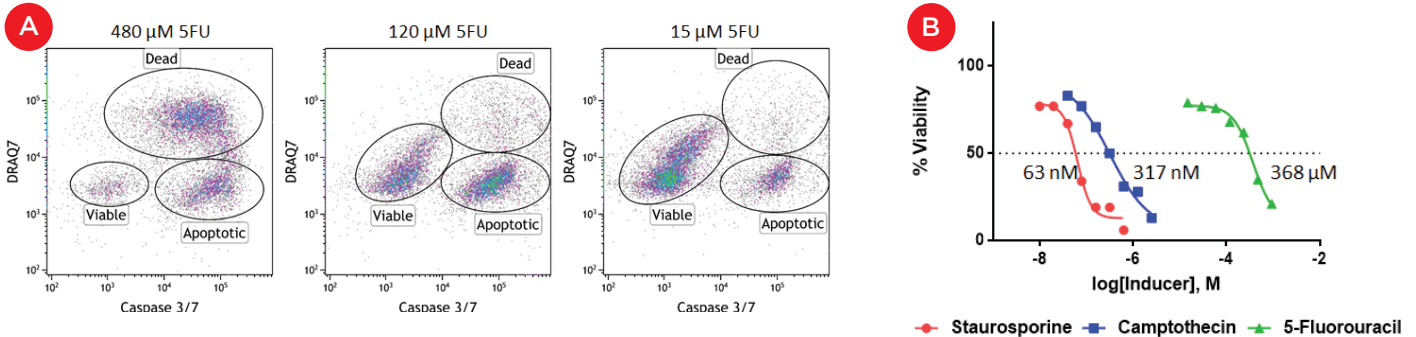


Figure 3. A) 5-FUを48時間処理したHCT116細胞を生細胞（陰性）、アポトーシス（caspase 3/7陽性）死細胞（DRAQ7陽性）で染め分けたドットプロット図。 B) 3種のアポトーシス誘導剤で48時間処理したHCT116細胞の生存率を指標とした濃度依存曲線とIC50値

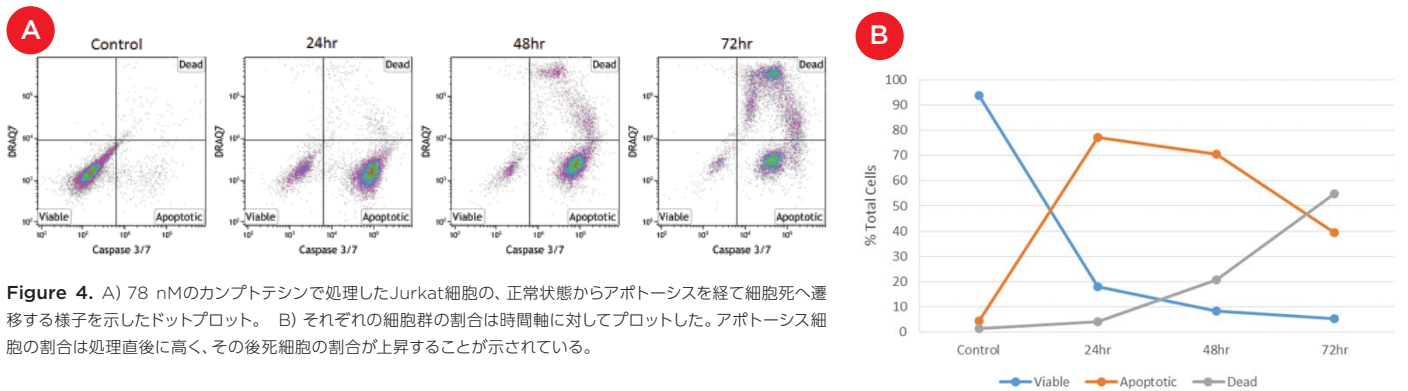


Figure 4. A) 78 nMのカンプトテシンで処理したJurkat細胞の、正常状態からアポトーシスを経て細胞死へ遷移の様子を示したドットプロット。 B) それぞれの細胞群の割合は時間軸に対してプロットした。アポトーシス細胞の割合は処理直後に高く、その後死細胞の割合が上昇することが示されている。

さらに、Biomek i-Series自動分注ワークステーションは、マイクロプレート遠心機やプレートウォッシャー、インキュベーターといった機器を直接接続することができます (Figure 1B)。今回用いた試薬については添加後に洗浄除去する作業は必要ありませんでしたが、混在した対象物からの特定の集団の判別といった抗体ベースの実験の操作も容易に自動化できます。さらにサンプルチューブベースのフローサイトメーターを用いた解析が必要な場合、Span-8分注装置を用いることで迅速にチューブ内のサンプルを処理できるほか、プレート単位で処理したサンプルを最終的にチューブに移し換えて測定するなどの操作の自動化が可能です。最後にハイスループット用のSAMI EXソフトウェアによって染色から解析までの作業をスケジュール管理することができ、大量の枚数の処理でもプレート間の操作の均一化を図ることができます。

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒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 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460
 e-mail bckkcas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>