



Vi-CELL XRを使った生死細胞数測定自動化

著者:Lena Leeは、Beckman Coulter Life Sciencesのマーケティング・マネージャーであり、Vi-CELLシリーズを担当しています。彼女は、カリフォルニア・ロングビーチ州立大学で生化学の理学学士号を取得しています。

はじめに

最適な生育条件下において細胞を培養することは、多くのバイオ医薬品の製造にとって非常に重要な技術です。一般的に、培養中の細胞の状態は、細胞濃度および生存率で評価されています。バイオリアクターやフラスコで細胞を培養している多くの培養施設では、トリパンブルー染色による細胞の生存率を手動(マニュアル)で計測しています。生細胞は正常な細胞膜を有するため、トリパンブルーでは染色されません。一方、死細胞は細胞膜が壊れているため濃青色に染まります。手動による計測方法では、これら一連の染色作業をする人が必要となり、血球計算盤と光学顕微鏡を用いて、染色された細胞と染色されていない細胞の両方を計測することで総細胞数と生存率(%)を計算しています。

このマニュアル計測は、多サンプルの測定に不向きであること、測定時間や人件費が必要など多くの問題を抱えています。また、試験者の主観的な判断、ピペティング操作の不均一性、または不十分な混合によるエラーなどにより、同一の細胞サンプルを計測している試験者間においてもばらつきが大きく、結果が異なることがあります。さらに、一般的にマニュアル計測では、数百程度の細胞しか測定せず、統計的に信頼性が低い結果となります。このようなばらつきが不安定な製造プロセスにつながる可能性があります。

細胞計測プロセスを自動化することで、試験者間のばらつきが除かれ、さらには、試験者の手間が省けることで、ほかの業務に従事することができるようになります。本稿では、細胞計測プロセスをマニュアル計測から自動計測へ変更した大手バイオ医薬品企業が実施した検証研究の主要なステップについて説明します。本検証研究では、生死細胞オートアナライザー Vi-CELL XRを用いました。

ステップ1. 測定精度の評価

検証研究の第1フェーズでは、Vi-CELL XRによる自動計測とマニュアル計測の精度を比較しました。この検証は、試験者間および、試験者内の%CVを計算し、Vi-CELL XRと血球計算盤を比較しました。精度の測定には、既知濃度のコントロール試薬 (1×10^6 ビーズ/mL) を使用しました。濃度コントロール試薬の使用により、サンプルのばらつきを排除し、実施する計測法の補正が行えるため、信頼性が担保できます。2人の試験者が同一操作条件下で3回反復してビーズ濃度を測定しました。手動およびVi-CELL XRの濃度コントロール試薬の測定結果は、濃度コントロール試薬のアッセイ・シート値と同等であり、適正範囲内でした (0.9×10^6 個/mL $\sim 1.1 \times 10^6$ 個/mL [1×10^6 個/mL $\pm 10\%$]) (表1および表2)。各計数値間および試験者間の変動係数は、両方の計数方法で5%以下でしたが、注目すべき重要な点は、Vi-CELL XRでは試験者間のばらつきがマニュアル計測より6倍も少なかったことです (2.81対0.46)。このようなばらつきの差は、世界中に広がった研究チーム、様々なシフト条件、および試験者間のトレーニング・レベルの違いに対応しなければならない世界的なバイオ医薬品企業にとって、大きな意味をもちます。

表1および表2 濃度コントロールビーズを用いた測定精度試験の結果

Vi-CELL XR	濃度(×10 ⁶ 個/mL)	試験者内%CV
試験者1の平均	1.03	1.68%
試験者2の平均	1.02	4.10%
試験者1と2の平均	1.02	2.89%
試験者1~2の標準偏差	0.005	
試験者1~2の間の%CV	0.46%	

血球計算盤	濃度(×10 ⁶ 個/mL)	試験者内%CV
試験者1の平均	1.03	1.12%
試験者2の平均	0.99	6.44%
試験者1と2の平均	1.01	3.78%
試験者1~2の標準偏差	0.028	
試験者1~2の間の%CV	2.81%	

ステップ2. 画像解析パラメータの最適化

一般的に、Vi-CELL XRのような自動細胞カウンターは、様々な細胞株に合わせて計測が最適化されるように設計されています。そのため、画像解析パラメータを設定することができます。解析設定の最適化は、精度および過去の結果との相関を確認するために重要です。測定開始時には、「デフォルト(初期設定)の細胞タイプ」を使用することが推奨されます。そのデータを基に、細胞タイプ設定を調整し、対象細胞の解析設定を最適化します。

- ・最小および最大のサイズ範囲設定 – このパラメータは、細胞株集団の代表的な細胞以外の大きな、または小さな細胞を計測から排除するために使用します。
- ・死細胞の最小真円度 – このパラメータは、死細胞としてカウントされる可能性のあるデブリスを除くために使用します。

最初に細胞タイプの最適化を実施し、次に異なるロットの細胞株を分析することで、細胞タイプをさらに最適化します。こうすることで、ロット間の再現性を確実にできます。

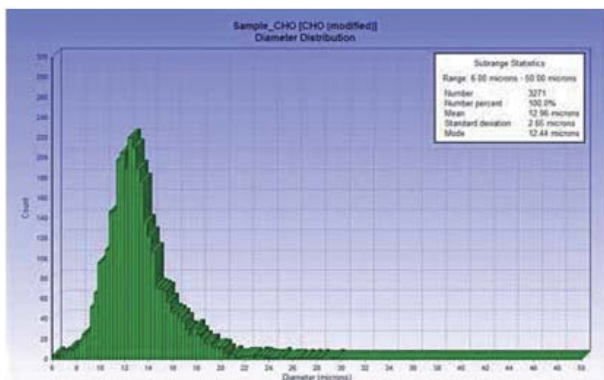


図1. Vi-CELLソフトウェアでの細胞サイズ分布のプロット

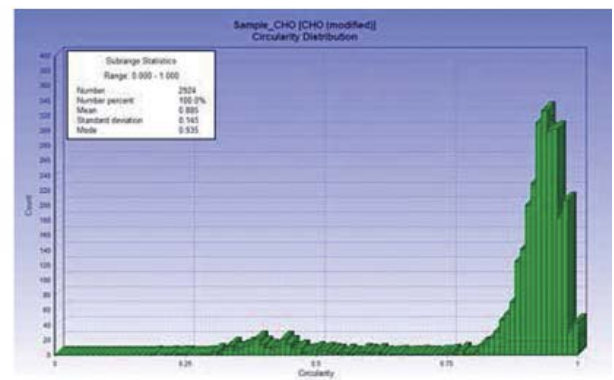


図2. Vi-CELLソフトウェアでの細胞の真円度分布のプロット

ステップ3. Vi-CELL XRの検証

検証前には、細胞の生死判定基準を設定しました。一方で、測定に伴うばらつきや誤差をどこまで許容するかも考える必要があります。例えば、サンプル処理、サンプルを測定するタイミング、機器間の誤差、および試験者間の誤差は結果に影響を及ぼします。また、Vi-CELL XRと手動による方法との間の固有のばらつきもあります。Vi-CELL XRは、手動計測の10倍多く細胞を計測することによって、サンプル集団を多くし、結果的に測定の精度が高くなります。

細胞を測定する上で重要な2項目について、Vi-CELL XRとマニュアル法を比較し、検証を行いました。表3、表4は、Vi-CELL XRの細胞タイプ、「最小サイズ範囲設定」を11.5 μm (表3) または12. μm (表4) に設定し、マニュアル測定と比較検証を行いました。測定項目は、総細胞濃度 (TCD: Total Cell Density) および生細胞濃度 (VCD: Viable Cell Density) です。検証は、複数の細胞ロットを使用し、サンプリング間隔を変えて測定しました。得られた測定結果を対t検定で統計学的に比較しました。

その結果、Vi-CELL XRの最小サイズ範囲をわずかに変更しても、マニュアル測定結果との間に優位な差は認められませんでした。

表3および表4 Vi-CELL XRの最小サイズの範囲設定を変更したときの対t検定結果

設定値11.5 μm Vi-CELL XR vs マニュアル法	設定値12 μm Vi-CELL XR vs マニュアル法
対t検定	対t検定
P値=0.2953	P値=0.1255
有意差あり?(<0.05)=いいえ	有意差あり?(<0.05)=いいえ
対の数=20	対の数=20

ほかの重要な考慮点

・ 十分な懸濁/ミックス

正確な測定結果を得るためには、培養細胞液、または濃度コントロール溶液を測定前にきちんと懸濁することが重要です。

・ 比較はできる限り並行して

可能な限り短時間に、同時期に、マニュアル法と自動化された方法でサンプルを分析してください。生存率は経時的に変化し、結果に影響を及ぼします。

・ 機器の校正

サンプル測定開始前に、機器が適切に校正されているかどうかを自動計測器のサービス・エンジニアに確認してください。

結論

本検証により、生死細胞オートアナライザー Vi-CELL XRが、現在用いられているマニュアル法による細胞計数測定に匹敵する正確性、適格性を持つことが実証されました。Vi-CELL XRを用いた自動計数測定とマニュアル法による細胞計数測定間に有意差は見られませんでした。Vi-CELL XRの測定では、ばらつきが有意に少ないという結果が得られました。

すでに確立されている方法からの移行には、時間、忍耐、および新しい方法への信頼が求められます。十分なデータを集めて優れた統計的分析を適用することにより、新しい計測プロセスへの変更がサポートされ、意味のあるものとなります。自動化プロセスにより、血球計算盤の使用に伴う試験者間固有の計数のばらつきが排除されます。Vi-CELL XRなどの自動生死細胞アナライザーは、血球計算盤と比較し10倍多くの細胞を計数しているため、高い統計学的信頼性が得られています。Vi-CELL XRは、今後の分析(再解析)に備えて過去の画像データを保存することができます。規制を受けている施設での使用のため、血球計算盤と異なり、Vi-CELLソフトウェアは電子記録に関する21 CFR Part 11規則(米国連邦規則第21条第11章)に遵守するようデザインされています。本稿で示されているように、新しい方法を採用する大きな利点は、試験者間のばらつきを大幅に削減し、結果の信頼性を高めることにあります。

注：本稿は、旧式の生死細胞オートアナライザーと置き換える際にも適用できます。

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>