

CELL HANDLER™によるiPS細胞の分取自動化

京都大学iPS細胞研究財団(CiRAF_F)細胞調製施設(FiT)では、再生医療用iPS細胞の製造が行われている。その作業の1つとして高品質なiPS細胞の選別が手作業で行われている。そこで、CELL HANDLER™を用いたiPS細胞シングルセルおよびコロニーの自動分取の可能性について共同実験を行った。

■ 実験1. CELL HANDLER™を用いたiPS細胞シングルセルの分取

【目的】

- A) CELL HANDLER™による、iPS細胞シングルセル分取能力(分取成功率、実運用時間)の確認
- B) iPS細胞の培養条件(播種後培養期間)による生着およびコロニー形成の評価

【方法】

培養期間の異なるiPS細胞を3種類用意し、6,000 cells/wellで6-wellマイクログリッドプレートに播種した。播種した細胞をCELL HANDLER™にて96-wellプレートに分取し、9日間培養を行うことで、コロニーの生育状態を確認した(Figure 1)。

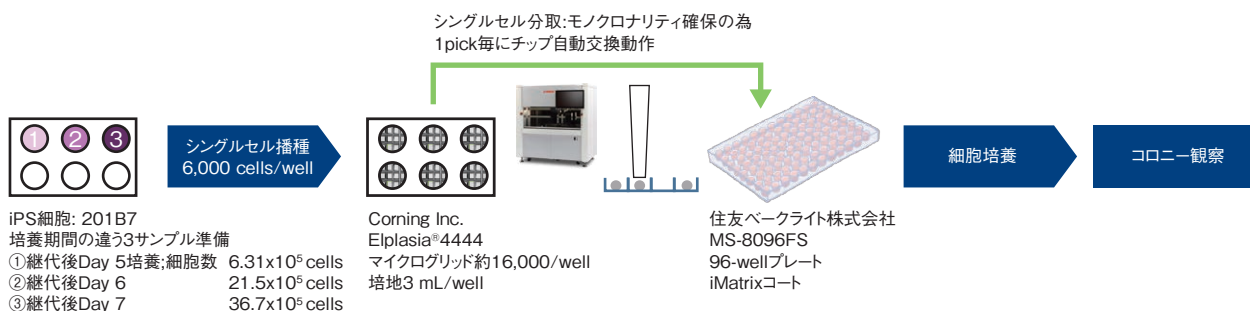


Figure 1

【結果】

- A) マイクログリッドプレートに6,000 cells/wellの濃度でiPS細胞シングルセルを播種することで、CELL HANDLER™による1細胞選択、分取が可能であった(Figure 2)。また、分取対象グリッド以外の細胞分取は確認されず、1細胞分取毎にチップ交換を行う動作と合わせモノクロナリティを確保できた。今回の実験では、準備から作業終了までの時間は76分であった(Table 1)。これは、CELL HANDLER™操作未経験者の作業検証であり、現場再現性のある時間であると考えられる。
- B) 分取後の生着率は70%前後であり高い生着率を確認できた。サンプル細胞の培養条件(継代後Day 5、Day 6、Day 7の培養細胞)による生着、コロニー形成への顕著な差は認められないことを確認できた(Table 2、Figure 3)。

<p>【準備】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・機器立ち上げ、細胞準備:約10分(細胞播種沈下待ち含む)
<p>【CELL HANDLER™】 96-well分ピックアップ</p> <ul style="list-style-type: none"> ・サンプル細胞写真撮影: 約14分 ・ピックアップ細胞選択: 約10分(マニュアル選択) ・セルピックアップ: 約30分(1細胞毎にチップ交換)* ・移動先細胞写真撮影: 約7分 ※チップ交換なし設定では、約5分に短縮可能。
<p>【作業終了】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・機器片付け: 約5分

Table 1. 作業時間まとめ

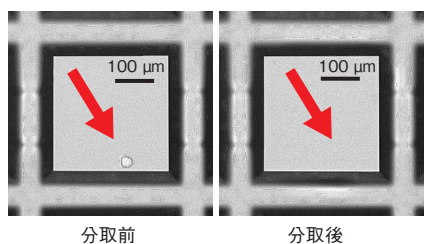


Figure 2. 細胞分取前後の確認

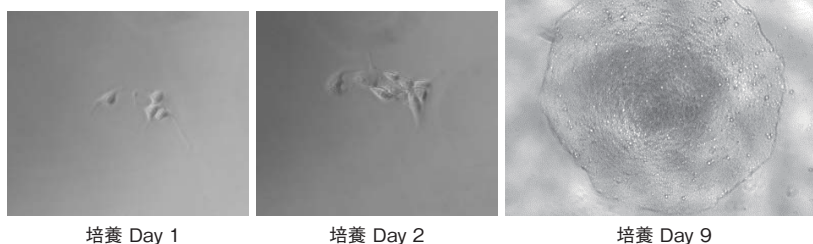


Figure 3. 分取後の細胞培養

※データ提供、FiT

サンプル①(継代後Day 5)	サンプル②(継代後Day 6)	サンプル③(継代後Day 7)
36/48 well (75%)	35/48 well (73%)	31/48 well (65%)

Table 2. iPS細胞シングルセル分取後の生着、コロニー形成割合

※データ提供、FiT

CELL HANDLER™によるiPS細胞の分取自動化

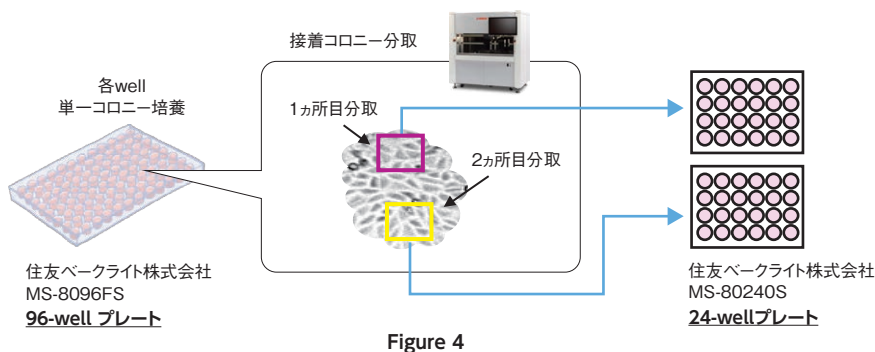
■ 実験2. CELL HANDLER™を用いたiPS細胞接着コロニーの分取・複製

【目的】

CELL HANDLER™による、iPS細胞接着コロニー分取・複製効率(分取成功率、生着率)の確認

【方法】

96-wellプレートにおいて、各ウェルにiPS細胞シングルセルを播種し(N=8)、単一コロニーを作成した。形成したコロニーをCELL HANDLER™を用いて、それぞれ2箇所分取り複製を行った(Figure 4)。それらを5日間培養し、その生育状態を確認した。



【結果】

8個のコロニーに対し複製(N=2)を実施し、全て成功した。分取後、5日間の培養を行い、全ての分取細胞においてコロニー形成を確認した(Figure 5)。

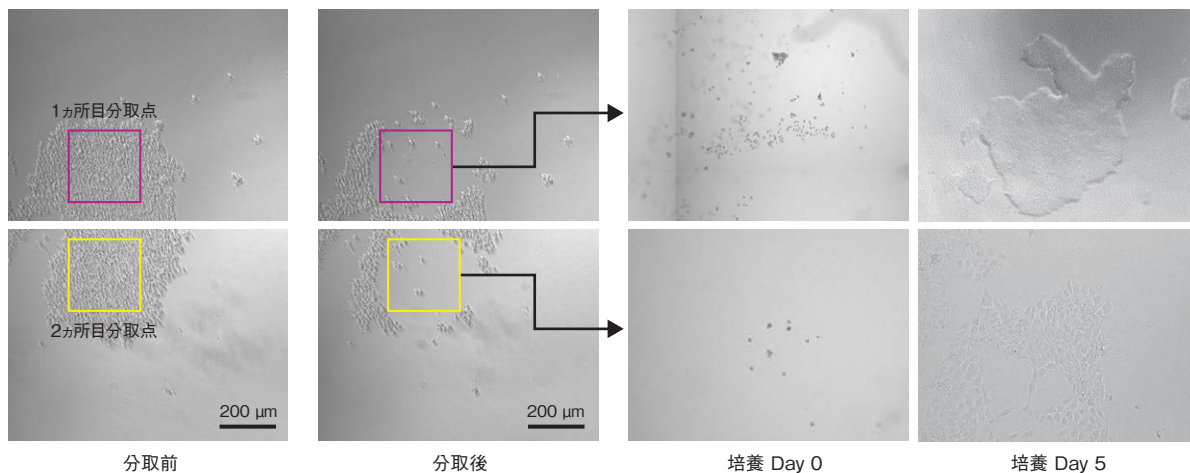


Figure 5. コロニー分取と培養の様子

【まとめ】

iPS細胞シングルセルの選択分取にCELL HANDLER™を使用することで、手作業よりも確実かつ高速に作業を実現し、多くの培養パターンを従来よりも短時間で評価することができる。これにより、高効率なモノクローナルiPS細胞コロニー樹立が期待される(実験1)。また、CELL HANDLER™により、iPS細胞接着コロニーの複製が高い成功率で実施できることを確認できた。これにより、iPS細胞の拡大培養が従来よりも容易になることが期待できる(実験2)。

謝辞

本実験を遂行するにあたり、公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団(CiRAF)細胞調製施設(FiT)、塚原正義先生、一阪朋子先生との共同実験並びにデータ提供を頂き厚く御礼申し上げます。

