

超高速のフローサイトメトリープラットフォームを最大限に活用するヒントとコツ

はじめに

臨床分野での成功をより正確に予測するモデルの必要性が高まる中、創薬担当研究者の業務は、さらに複雑な細胞ベースでの研究・分析に移行しつつあります。候補化合物を評価し、疾患の病態生理を解明するために、最新の*in vitro*研究では、さまざまなタイプの細胞（例：iPS細胞、健常組織と罹患組織から得られた患者由来細胞）やモデル構築方法（例：オンチップ臓器デバイス、3次元比較培養）が採用されていて、それらは、従来の2次元単層細胞培養法に比べ、生理学的により実態に近い構造となっています。ただし、こうしたシステムを有効活用するには、細胞ベースでの研究・分析において、ハイスループット処理とマルチプレックス解析を実現できる、適応性に富んだ分析テクノロジーとワークフローが重要となります。

細胞ベースの分析では、細胞単位ベースでの情報を提供する機器としてフローサイトメトリーが依然として有力なツールです。しかし、従来のフローサイトメトリーシステムは、ハイスループットなデータ獲得が要求される最新の創薬研究に適した設計ではなく、そのまま研究ワークフローに当てはめようとする、ワークフローは非効率的になってしまいます。最新の創薬研究に適合するアッセイテクノロジーが要求する差し迫ったニーズに対処するため、フローサイトメトリーの機能は近年進化を遂げています。本稿では、シミュレーションのためのアッセイのミニチュア化や自動化機能など、超高速フローサイトメトリープラットフォームに焦点をあてて、生物学的に関連性の高い知見をより簡単にもたらすと同時に、実験のスループット（処理能力）を劇的に向上させる方法をご紹介します。

同一プレートウェル内の細胞とビーズを測定し生物学的関連性の高い情報を取得

フローサイトメーターのアプリケーションにおいて、コード化ビーズを使用した免疫アッセイは業界標準となっており、コード化されたキャプチャービーズが分子間相互作用を用いた支持体として使われ、蛍光発光の検出によって細胞が分析されます¹。コード化ビーズをベースとした細胞分析能力とその感度は年々向上していますが、通常、ビーズと細胞は細胞処理とその後のビーズ解析という手順で別々のワー

クフローで分析されます。これに対し、超高速フローサイトメトリーでは、マイクロプレートの同一ウェル内において複数の分析を同時に行うことができます。図1のとおり、細胞とビーズを用いた複数のアッセイ方法を組み合わせて、サイトカイン分泌、細胞の健康状態、免疫フェノタイプ、増殖などの評価が「同一のウェル」で実現します。細胞と上清液を同時分析することで、より正確なデータと一貫性をもたらすとともに、ストリームライン化によりワークフローが簡素化されます。こうした効率の向上が、直観的な操作ができるプラットフォームによって達成されることで、特定の選択基準を満たすデータの傾向や現象の特定がより容易になります。

Sartorius iQue® (VBR) 用ヒトT細胞活性化キット同一ウェル内での反応図

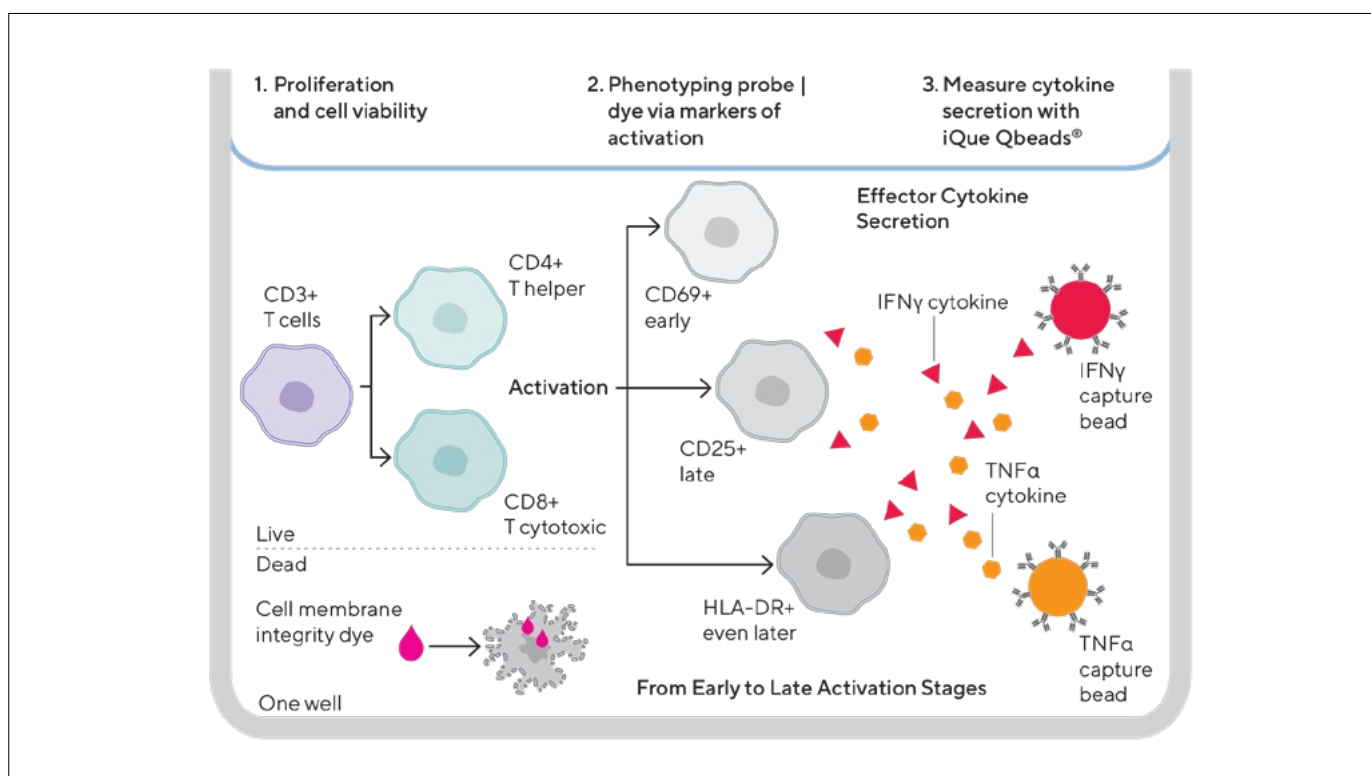


図1: ヒトT細胞活性化による細胞およびサイトカインプロファイリングキットのアッセイ原理。3つの早期/後期活性化マーカー、CD69（早期）、CD25（後期）、HLA-DR（さらに後期）の発現に合わせて、異なるT細胞フェノタイプのプロファイルが明らかになります。2種類のエフェクターサイトカイン（IFN γ およびTNF α ）も、同一ウェルの中でサンドイッチ免疫アッセイ形式の2プレックスQBeadsによって定量されます。T細胞増殖またはコード化された標的細胞の同時測定も可能ですが、この図には含まれていません。

既存ワークフローの解体と統合ストリームライン分析

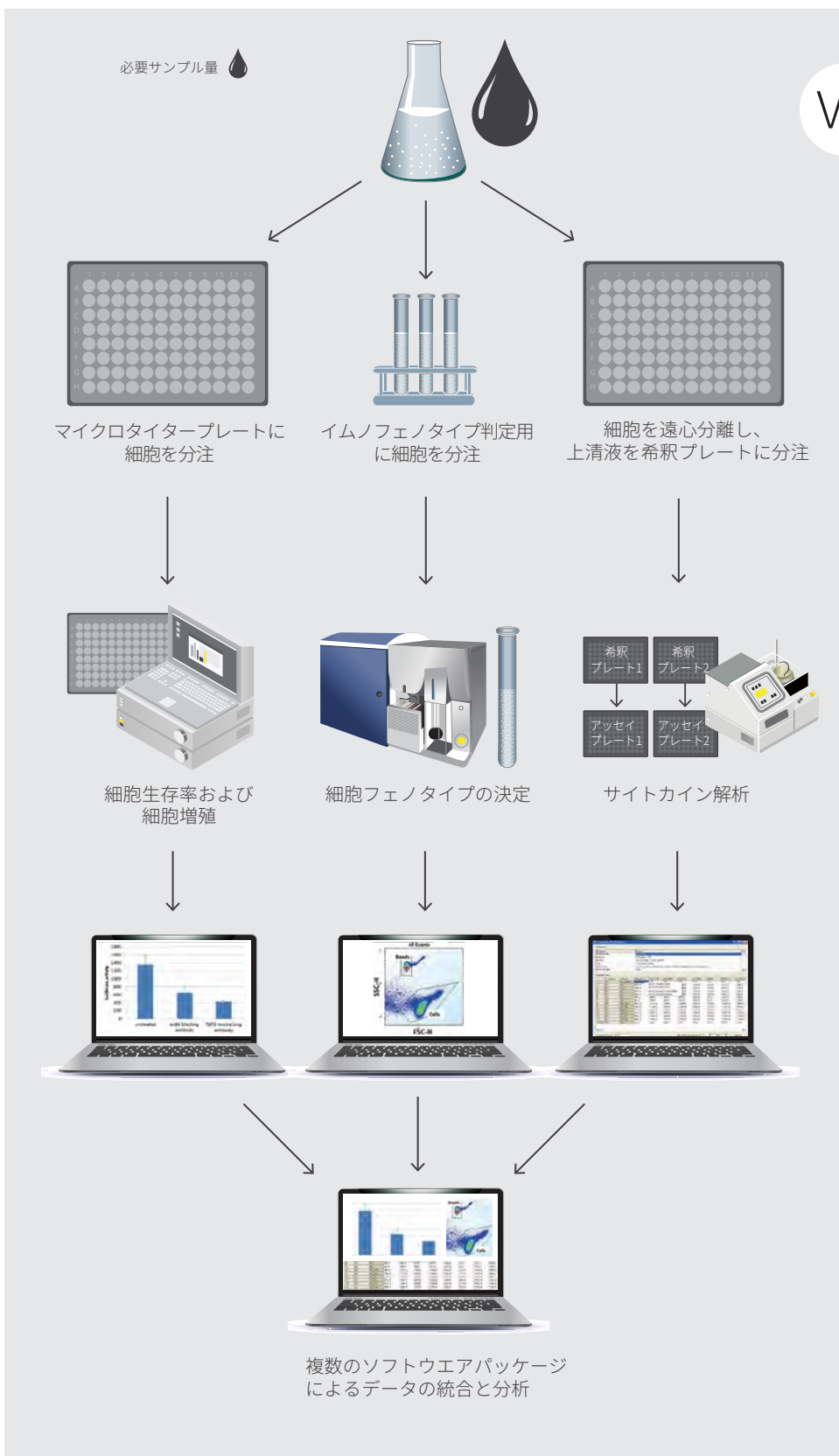
一般的なフローサイトメトリーは、他の多くの従来実験手法と同様に、多サンプルの処理能力とそれにかかわる多項目分析システムに限界があるため、細胞の健康状態、機能、タイプ特定に関するデータの獲得には、複数の分析機器が頻繁に使用されます²。

プレートリーダー、一般的なフローサイトメトリー、ELISA法を用いることで、分泌タンパク質の免疫フェノタイプ検査と定量化は行える一方、別々の機器やサンプルから得た

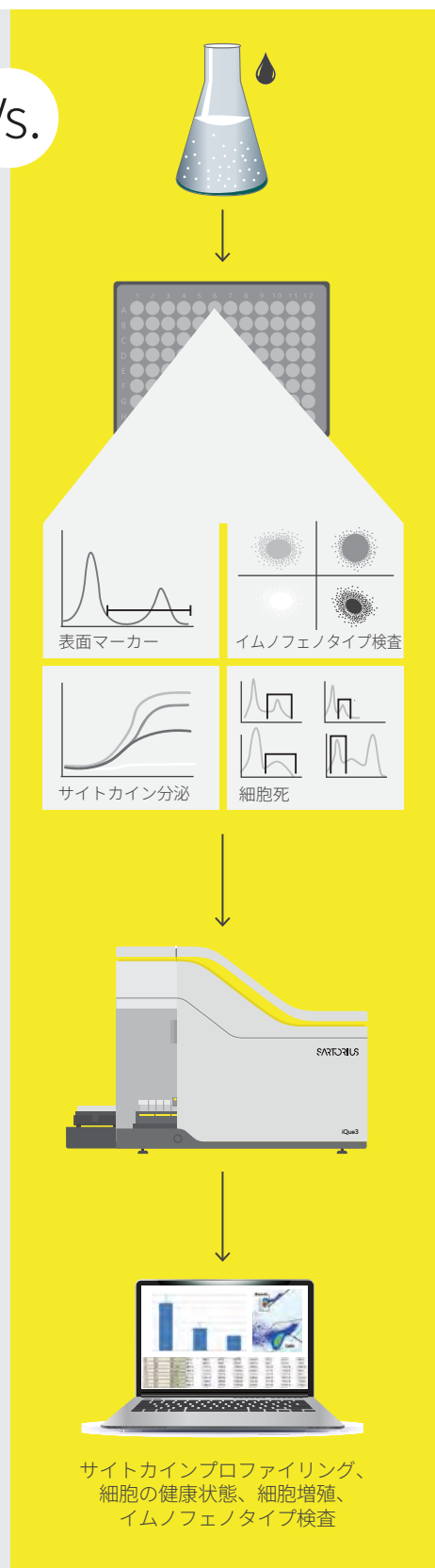
データをまとめる作業は冗長で効率的ではありません。超高速フローサイトメトリープラットフォームは、従来のフローサイトメトリーでは不可欠だった、分析、可視化、解釈のためのデータ移転作業をなくします。複数の分析法から得られたデータの結合においては、正確性と信頼性に関する課題が生じます。ワークフロー内の各手法には固有の限界と許容誤差があり、多くのステップで作業をする多数のラボメンバーや、多数のサンプルが必要になり、誤差発生の可能性はさらに増加します。

従来の ワークフロー

超高速フロー サイトメトリーの ワークフロー



Vs.



実験の柔軟性をさらに高めるサンプル量の削減

超高速フローサイトメトリーシステムにおいて、分析に必要なサンプル量が削減できることで、1回ごとの操作あたりの分析サンプル数増加、処理時間全体の短縮、試薬コスト削減が実現します。

一方、アッセイのミニチュア化によるメリットは実験の柔軟性向上により大きく影響し、多くの開発努力は、そのメリットを最大化するサンプリング技術向上に費やされています。超高速フローサイトメトリーシステムは、(1,536ウェルプレート中) 4 μ L、あるいは (96および384ウェルプレート中) 10 μ L程度の少量でサンプルを分析でき、デッドボリュームを考慮する必要はありません。さらに、必要であればサンプル10 μ Lからわずか1 μ Lという非常に少量のサンプリングも可能です。従来の一般的なフローサイトメーターは、チューブベースでサンプリングをするように設計されており、多量のサンプルをデッドボリュームとして考慮しなくてはならず、超高速フローサイトメトリーとは全く対照的です。

微量サンプリングテクノロジーは、高度な細胞モデル (例：生体模倣システム)、や希少な患者由来組織といった、サンプル量が本質的に限られる場合に特に力を発揮します。徹底してサンプル量の削減を追求することで、さまざまな濃度におけるサンプルの分析、triplicate (n=3) の測定結果の入手、より多くのコントロール実験の実施、または、より広範なEC50/IC50曲線を作成します。このように実験の柔軟性が高いことから、研究者はデータや意思決定に、より強い自信が持てます。例えば、T細胞受容体活性化の媒介物質に関するプロファイリングは、多数のパラメータ評価を必要とするワクチン、がん治療、自己免疫疾患の治療などの開発に極めて重要です。1回の実験で、抗体の検出およびT細胞の増殖と細胞膜の完全性を評価することができる、シンプルなワークフローの概要を図2に示しています。iQue®超高速フローサイトメトリープラットフォームにおいて、目的とするアッセイ専用の試薬キットを用いると、標識化、蛍光補正、試薬最適化のステップが不要となるため、サンプルと試薬の使用量がさらに削減されます。

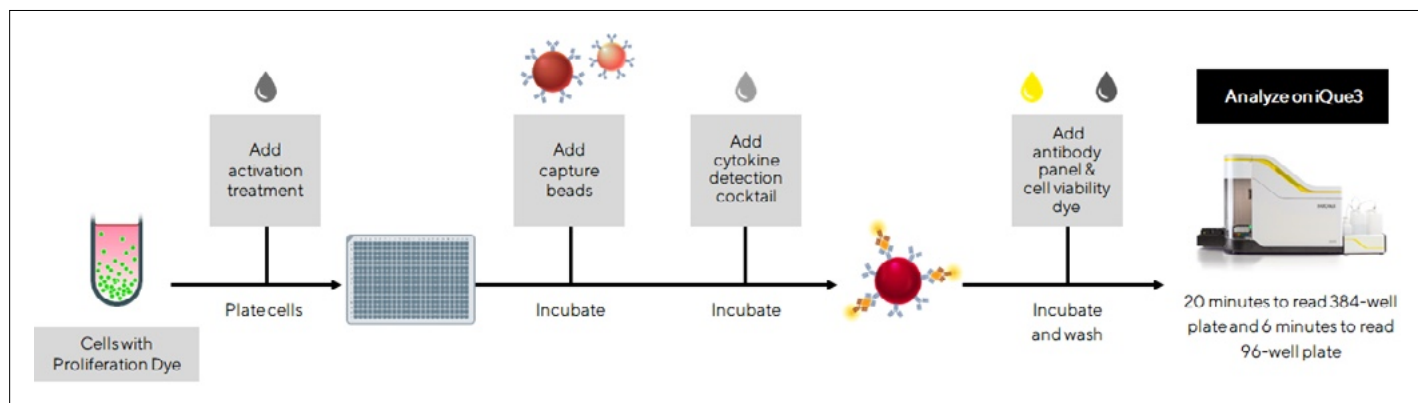


図2:iQue®超高速フローサイトメトリープラットフォームを用いたサンプル分析のステップ概要

テンプレートと自動化がもたらす 迅速なデータ獲得

ライフサイエンスにおけるデータ管理は、最新の研究が抱える重要な課題のひとつで、ワークフローの最終段階であるデータ獲得・分析がボトルネックとなれば、せっかくのハイスループット実験のメリットが無くなってしまいます。実験のクイックセットアップ能力は、ワークフローに準じたデータ獲得を行う上で重要となりますが、他社のフローサイトメトリーでは、その実行に高度な専門知識と集中力が必要とされます。超高速フローサイトメトリーシステムが備え持つシステムダイナミックレンジにより、フォトマルの調整が不要となり、また柔軟なサンプリング設定によりマイクロタイタープレートの最適な使用を可能にします。実験のシステム設定を今後の使用に備えてテンプレートとして保存できるため、継続する実験の開始時にかかる時間が節約されます。また、テンプレートの保存は、ゲート、蛍光補正、データ測定基準など、パラメータの一貫性の維持にも役立ちます。この機能により、研究者は保存されたテンプレートを開いてデータの収集と分析を「プラグ&プレイ」でき、適切なパラメータを毎回選択する必要がなくなります。

自動化への適合性は、再現性とトレーサビリティの向上を求める現代の研究業務にとって重要な検討事項となります。そのため、iQue®超高速フローサイトメトリープラットフォームは、プレートローダーをはじめとする自動化対応のサンプル調製用機器と接続可能な設計になっており、ヒトの介入を必要とせずにアッセイのセットアップや分析が行えます。バイオセーフティーレベル2以上の研究室では、創薬を目的として、より大きなバイオセーフティーキャビネット内にiQue®を設置することが可能です。データ品質管理(QC)に関する自動追尾機能は、機器に起こりうる性能上の課題を運転前に特定できるため、希少なサンプルの保護と高品質データの確実な獲得に役立ちます。さらにスムーズなワークフローを実現するため、第三者の自動制御システムがiQue®ソフトウェアにリモートアクセスし、以下の項目に関連するさまざまな範囲のタスクを実行できます。

- 機器の保守
- 実験のセットアップ
- データ獲得
- データ管理

同一ウェル内の細胞とビーズからストリームラインデータ取得を行う自動分析においては、得られたデータをより包括的に分析できるプログラムが必要となります。リモートワークが一般的となった現在では、共同作業や進行状況を維持するうえで、研究室のデータに外部からアクセスをしてリモートで分析できることが極めて重要となります。超高速フローサイトメトリーシステムはマルチライセンスオプションにより複数人で使えるため、報告書や論文を自宅やオフィスの都合のよい場所で作成できます。システムソフトウェアと自動化、テンプレート毎のデータ解析は、iQue®超高速フローサイトメトリーのワークフローがもたらす、ひとつの最大の強みです。さらに、21 CFR Part 11準拠ソフトウェアを組み込むことで、追跡可能な電子記録を提供します。iQue®エンタープライズ版では、複数ユーザーのリモートアクセスと安全なデータ共有が可能なため、ユーザーはネットワークに接続した任意のコンピューターから実験のセットアップ、運転、分析を実行できます。迅速なデータダウンロードのため、データ量の多いファイルには軽量モードが選択できます。

従来の手間のかかる細胞ゲーティング作業を軽減するために、画期的な可視化・分析ツールが開発されました。iQue®のゲーティング機能は、作業の面倒な側面を回避しながら、対象細胞集団を明確に、かつ、容易に可視化することから、データ分析に極めて有用です。

iQue® 超高速フローサイトメトリープラットフォームの画期的なデータ可視化ツールは以下のとおりです。

- **プレートビュー:** サンプルプレート全体を可視化して、サンプルの特性をより迅速に特定します。
- **ヒートマップ:** 複数のサンプルプレート全体にわたり、特定の測定基準を可視化します。
- **プロファイルマップ:** ユーザーが定義した特定の特性を有するウェルを(複数の測定基準に基づいて)特定し、さらなる分析のためにツールを追加します(図3)。
- **スライダーバー(プロファイルマップの機能):** 新たな作成基準に合致するウェルのリアルタイム調整と可視化を可能にします。

低分子、抗体、その他の生物製剤のスクリーニングには、多くのサンプルプレートを必要とすることが多く、多数の化合物や生物製剤の評価のためのスクリーニング試験や、数日間にわたって頻繁に分析を必要とするプロファイリング実験の場合、すぐにサンプルプレート枚数が増えてしまいます。別々の日に取得されたフローサイトメトリーデータを効率的に比較することは、ある種のチャレンジとなることが分かります。そのため、このプロセスを、より容易に、かつ迅速にするために、高度な可視化ツールが開発されてきました。iQue Forecyt®ソフトウェアのPanorama機能を用いると、大量のマルチプレートデータでも効果的かつ迅速に可視化できます。それぞれのウェルとプレートの関連データは、Panorama機能で表示されるプロファイルマップ、ヒートマップ、折れ線グラフを使用することで、ほぼリアルタイムで解釈ができます。

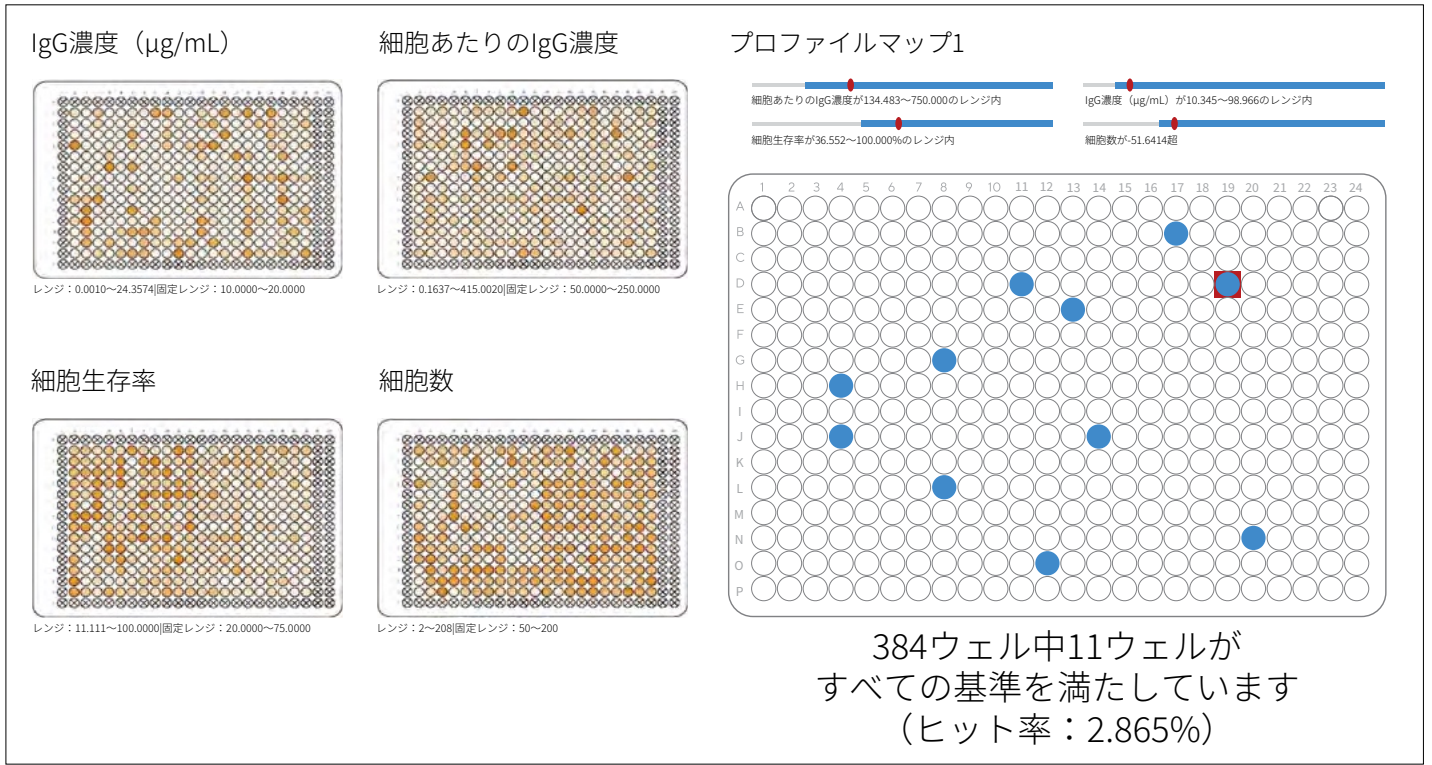


図3: マルチパラメトリックデータを組み合わせてユーザー定義による基準を満たすサンプルを特定するため、その解釈を容易とする可視化をプロファイルマップは行います。

よりシンプルなワークフローと洞察力を増したデータ分析

最新の創薬研究に携わる研究室は、「臨床分野での成功につながる生物学的洞察を得る」という大きな重圧にさらされています。それにもかかわらず、従来のフローサイトメトリー法は、必要な多サンプル・ハイスループット処理を遂行する設計・構造ではありません。

超高速フローサイトメトリーは、従来のワークフローを劇的にスクラップ・アンド・ビルドしました。これにより、データのばらつき低減、また時間と費用を節約し、生物学的に適切なデータを生成するため、より優れた実験ができるように高い柔軟性を提供します。決定的な特徴として、同一ウェル内でフェノタイプとサイトカインを同時に評価できるので、従来あった複数の機器から得られるデータをまとめる必要性がありません。

このストリームライン化されたアプローチと画期的な可視化ツールにより、将来的に展開の可能性があるデータを得るまでの時間が短縮され、研究者はデータへの自信をさらに深めることができます。これらのデータは、規制当局の要件に従った作成および保管が可能だと思われます。

参考文献

1. Surviladze, Z., Young, S. M., & Sklar, L. A. (2012). High-Throughput Flow Cytometry Bead-Based Multiplex Assay for Identification of Rho GTPase Inhibitors. In F. Rivero (Ed.), Rho GTPases (Vol. 827, pp. 253–270). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-442-1_17
2. Black, C. B., Duensing, T. D., Trinkle, L. S., & Dunlay, R. T. (2011). Cell-Based Screening Using High-Throughput Flow Cytometry. ASSAY and Drug Development Technologies, 9(1), 13–20. <https://doi.org/10.1089/adt.2010.0308>

ザルトリウス・ジャパン株式会社

東京本社

〒140-0001

東京都品川区北品川11-8-11

Daiwa 品川Northビル4階

Phone: 03 6478 5200 Fax: 03 6478 5494

Email: hp.info@sartorius.com

名古屋営業所

〒450-6411

名古屋市中村区名駅3-28-12

大名古屋ビルヂング11F

Phone: 03-6478-5200

大阪営業所

〒532-0003

大阪市淀川区宮原4-3-39

Phone: 03 6478 5203

Fax: 03 6478 5496



詳細はこちら: www.sartorius.com/i/que

掲載されている内容は、予告なく変更される場合があります。

©2023 Sartorius Japan K.K.

無断複写・複製・転載を禁じます。

ザルトリウス製品の名称はすべて、ザルトリウスAGおよび/またはその関係各社の登録商標および財産です。

04 | 2023