

また、セルソーターに関して一般的に言われる誤解の一つに、電荷による影響がある。フローセルチップを通過した細胞を含む液は、ピエゾ振動子により液滴形成され同時に荷電される。帯電した目的の細胞を含む液滴は、散乱光と蛍光の情報に基づき、偏向板を通過する際に逆極に引き寄せられコレクションチューブに滴下される。

この際の電荷により生細胞にダメージが与えられ、ソート後の生存率に影響を与えるという誤解がある。しかしながら、帯電は液滴の周辺にされるのみであり、液滴に高電荷で荷電されても細胞は影響を受けない。コレクショチューブ内の培地等への着水の際も、電荷は水面に拡散して消滅するので、細胞には影響を与えないと考えられる。

## 終わりに

ダメージレスを掲げたフローサイトメトリーや、セルソーター以外にも、Micro fluidics法、光ピンセット(LOT: Laser Optical Tweezers)、マイクロマニピレーション、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM: Laser Capture Micro Dissection) など、シングルセルを分取することを目的とした手法が開発されてきているが、それぞれに一長一短があり、現時点で主流とはなっていない。

細胞を電荷により分取する手法は、ハイスループット、スピーディかつ正確に細胞を分取する点で長けており、着想としては50年前の論文で公表された手法ではあるが、現在においてもなお主流の手法である。

加えて、SH800では生存率向上に着目した設計がされていることから、シングルセルを用いた研究分野において、さらなる貢献が期待される

## Cell Sorter SH800Sの製品紹介

“どなたにでも”“すぐ使える”“日本発”次世代セルソーター

SH800Sは、これまで高く評価いただいた全自動セットアップ・小型化・低価格のコンセプトをさらに進化させた次世代セルソーターです。細胞の種類やアプリケーションに合わせて、最適なソーティングチップを3種類のオリフィスサイズ(70 $\mu$ m、100 $\mu$ m、130 $\mu$ m)から選択でき、ソーティングチップを使い分けるだけで幅広い研究目的、アプリケーションに対応したソーティングが可能です。また、より菌の混入リスクを抑えたい用途に合わせ、電子線照射された消耗品をご用意しました。

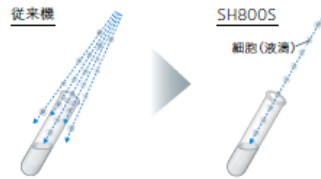
SH800Sは従来機以上に、初めてソーターを使われる方からヘビーユーザーの研究者まで幅広くワークフローの大幅な効率改善と低コスト化に貢献します。



### 細胞生存率が高い3つの理由

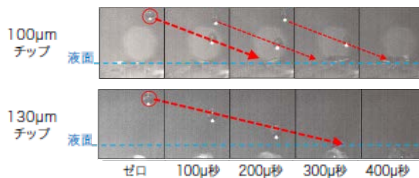
	他社従来機		SH800S		
	70 $\mu$ m ノズル	100 $\mu$ m ノズル	70 $\mu$ m チップ	100 $\mu$ m チップ	130 $\mu$ m チップ
1. チューブへの細胞の命中精度	低	低	高	高	高
2. 細胞が受ける落下衝撃 (落下速度の二乗に比例)	大 約24m/秒	大 約14m/秒 ~20m/秒	小 約18m/秒	小 約12m/秒	非常に小 約6m/秒
3. 細胞が受ける乱流衝撃	大	大	小	小	小

#### 1. チューブへの細胞の命中精度



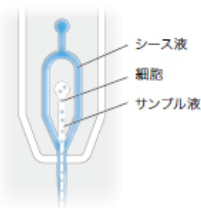
細胞がチューブの中央に落ちるよう、ソニー独自の“CoreFinder”テクノロジーがサイドストリームの角度と位置を全自動セットアップ

#### 2. 細胞が受ける落下衝撃 (落下速度の二乗に比例)



130 $\mu$ mチップの方が100 $\mu$ mチップよりも細胞がゆっくりと落下している。細胞に与えるダメージは、より小さい。

#### 3. 細胞が受ける乱流衝撃



乱流を起こりにくくする“センス・イン・スームステップ”(ソニー特許)でサンプル液とシース液の乱流が起きにくく、細胞にダメージを与えません。

図4 セルソーターSH800を用いた場合に生存率が高い理由

## シングルセルからの細胞培養： セルソーターSH800を用いて、細胞にダメージを与えずに分取する

単一細胞の分離は、生物学の基礎研究からバイオテクノロジーにおける工業的利用に至るまで、極めて重要な技術の一つである。単一細胞分離技術は、癌細胞のゲノム情報や遺伝子発現解析研究、タンパク質を産生する細胞の純化、再生医療への応用など、その適用例は枚挙に暇がない。次世代シーケンサ、ゲノム編集技術などの分子生物学的技術の革新的発展もあって、単一細胞利用の要望はますます広がっている。本アプリケーションノートでは、ソニー株式会社製セルソーターSH800を用いたシングルセル分取のデータを紹介し、ダメージレスセルソーティングの例を紹介する。

### 従来技術である限界希釈法の問題

シングルセルの単離を目的とする古典的な手法として、限界希釈法が用いられている。計算上1 cell/wellになるような希釈系列を作成し、顕微鏡にて各wellにつき細胞が存在しているかを確認する手法である。

この方法はシングルセルの単離に極めて高い精度を示すが、手技が煩雑であり、長時間の作業により細胞の生存率に悪影響を及ぼす可能性も否定できない。(図1)



### ソニー製セルソーターSH800を用いた シングルセルの分取

限界希釈法は上述の通り、シングルセルを分取するのに精度の高い手法であるが、作業効率が高いとはいえない手法でもある。

そこで、従来型のセルソーターより生存率の向上を志向して設計されたセルソーターSH800を用いて、シングルセルを分取した場合に分取後の生存率にどのような影響を与えるかを調べた。セルソーターSH800は、全自動セットアップ・小型化・低価格のコンセプトをさらに進化させた新世代セルソーターであり、幅広い研究目的、アプリケーションに対応することができる。

生存率確認の実験には、CHO-K1細胞 (DSファーマバイオメディカルEC85051005-G0) を使い、細胞培養にはHam's F-12 (Wako/Cat:087-08335) に10% FBS (Gibco/Cat:26140-079) とPenicillin-Streptomycin Solution (Wako/Cat:168-23191) を添加した培地を用いた。実験のワークフローを図2に示した。

#### 希釈系列 (各wellで確認されたコロニー数)

1cell/well	0	1	2	2	1	0	1	1	1	3
0.5cell/well	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
0.25cell/well	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.125cell/well	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0.0625cell/well	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0313cell/well	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

図1 限界希釈法によるCHO-K1細胞の播種とコロニー数

限界希釈法を用いたCHO-K1細胞のクローニングを実施した。

1 cell / wellになるように濃度調整したカクテルを作成し倍々希釈をして6系列の濃度別カクテルを作成して、それぞれ10 wellに播種した。理論濃度1 cell / wellで播種した場合は、wellに複数の細胞が存在するケースが確認された。細胞濃度を希釈すると、細胞が観察されないwellの存在比が増加した。

Sorting後の生存率を図3に示した。100μmと130μmのSorting Chipを使用した結果を比較すると、130μm Sorting Chipの方が高生存率であることが示された。この詳細は後述するが、130μmの方が100μmと比較して、細胞の着水スピードが遅いことに起因していると考えられる。

一方で、48 wells plateを使用した場合と96 wells plateの使用比較したところ、100μmと130μm Sorting Chipともに、96 well plateの方が高生存率であることが判明した。well サイズが小さい方が、Sorting後の生存率に有利なことが示唆された。

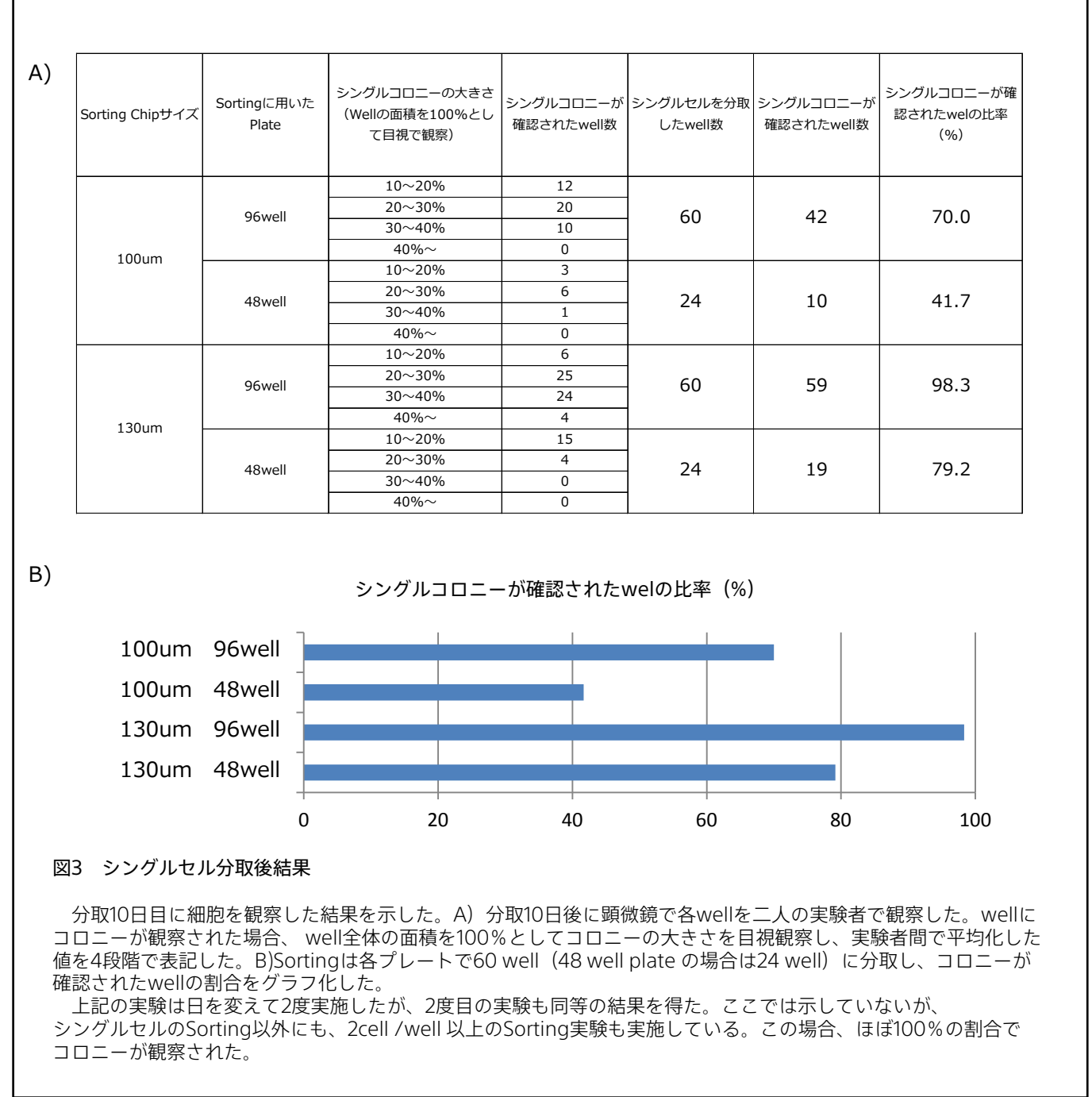
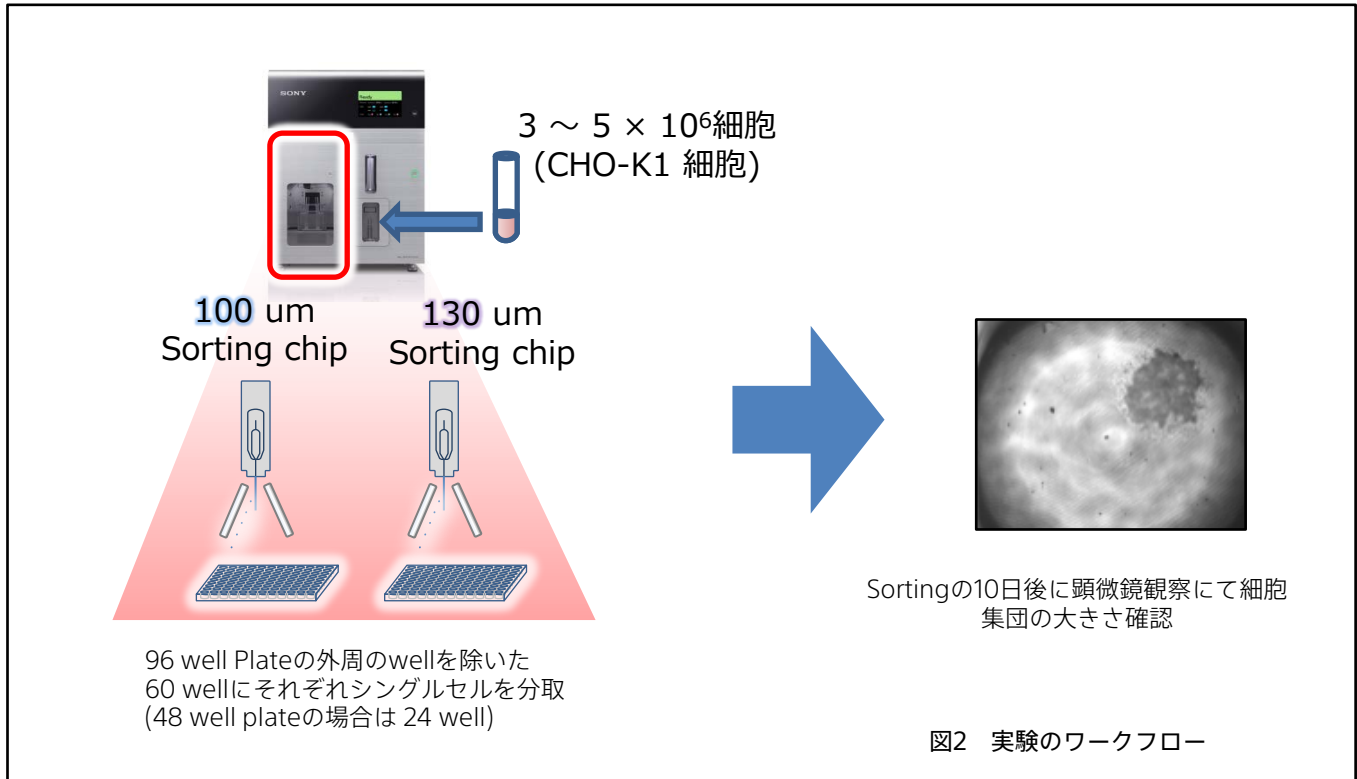
これは、培地量が少ない方が、細胞が増殖する過程においてオートクリン（分泌された物質が、分泌した細胞自身に作用する）に分泌する細胞増殖因子などの効果が、培地量が少ないほど効率的に増殖の効果を高めていることが考えられる。

**セルソーターSH800を用いた場合に生存率が高い理由**

前述したように、昨今の研究目的を達成するために、セルソーターを用いた細胞分取の際には、高精度のSorting技術に加えて、Sorting後の生存率も重要なポイントになる。セルソーターSH800はダメージレスソーティングを実現するための、下記の3点に着目した設計仕様が行われている。

**①命中精度**

Sortingを実施する際、チューブやプレートの壁面に当たらずに、BufferやMediumに粒子を着水させることが、その後の生存率を高めるうえで重要である。壁面に細胞が衝突した場合は、生存率が極めて低くなるのが容易に想像できることから、セルソーターSH800は他機種と比較して高い命中精度を得られるように設計されている。特に384ウェルプレートを使用の場合は、着水面が狭くなることから自動設定に加えて、手動でも設定できるようにされている。



**②細胞の落下速度**

Sorting時に細胞が壁面に当たらずに落下しても、着水時の衝撃は、生存率に大きく影響する。落下速度の二乗に比例することから、落下速度が遅いほど、細胞の生存率は上昇することが考えられる。

セルソーターSH800を用いた際の落下速度は、オリフィス径100μmでおよそ12m/秒であり、従来機の14-20 m/秒よりも低速度で落下する。また、オリフィス径130μmの場合、Sortingのスピードは落ちるものの、落下速度は6m/秒であり、細胞に与える着水時衝撃は非常に減少する。

**③細胞が受ける乱流衝撃**

通常、フローサイトメトリーを用いた場合、フロー内に屈曲部が存在すると流体内に乱流が発生し、細胞がらせん状に流れるため流体によるせん断力を受ける、といわれている。セルソーターSH800は、センスインスムーズチップの構造により、乱流が起こりにくい構造を取っており、いわゆるせん断力による影響は微小である。

上記3点の特徴を図4にまとめた。