

セルソーターSH800S/セルモーションイメージングシステムSI8000 希少細胞ソーティングと単一細胞の動き解析

【背景】

リキッドバイオプシーは、従来の生検と比較して、侵襲性が低く、頻回の検査が容易になる手法として、様々な疾患診断において有用と期待されている。

しかしながら、血液や尿などの検体には様々な由来の細胞が循環しており、その中からCTC（循環腫瘍細胞）のような希少細胞を検出・解析することは困難である。

フローサイトメトリーは、1秒間に数万から数十万個というオーダーで細胞の解析・分取が可能な手法で、動物細胞だけでなく、微生物への応用など多様な分野で応用されており、様々な研究機関において使用されている。

ここではセルソーターSH800シリーズとセルモーションイメージングシステムSI8000を使用して、希少細胞の解析と1細胞分取後の細胞の増殖解析の一例を紹介する。

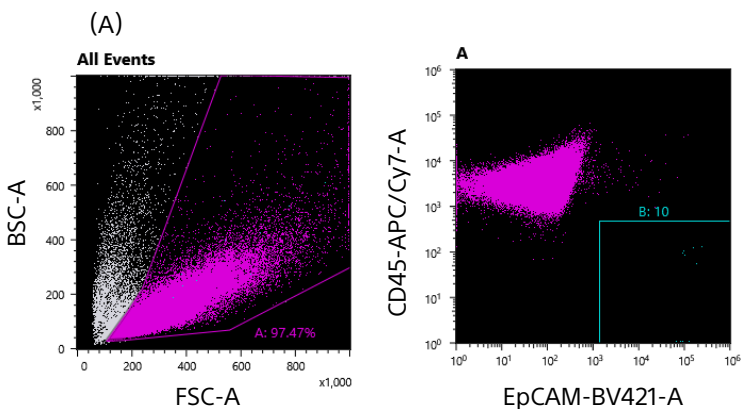


セルソーターSH800による希少細胞のカウント

1 mL中の希少細胞数がどの程度正確に測定可能かを検証するために、セルソーターSH800Sを用いて希少細胞のカウントと単一細胞分取による培養を試みた。本検討では、患者検体の入手が困難なことから、ヒト血球細胞に見立てたJurkat細胞に、CTCに見立てたヒト乳がん由来MCF7細胞を添加した混合サンプルを使用した。割合はJurkat細胞1 mL（約 2.5×10^5 個）あたり、MCF7を10細胞含む割合とした。

その後、懸濁液1 mLが20分間で測定できるような条件にサンプル圧を調整することで、懸濁液1 mL中に存在するMCF7の個数をEpCAM陽性/CD45陰性分画を指標にカウントした。3回の測定の結果、9、10、8個というカウント結果が得られた（図1A/B）。

上述のようにJurkat細胞の懸濁液からMCF7のみをセルソーターSH800Sで96ウェルプレートに単一細胞ソーティング後、単一細胞からの培養も試みた。ソーティングした細胞を18日間観察したところ、図1Cのような単一細胞から増殖した3次元のスフェロイドを観察することができた。

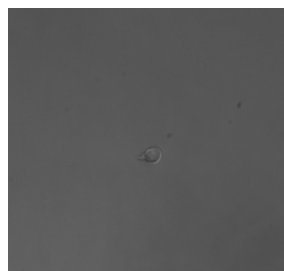


(B)

	Gate"B"総数	Gate"A"総数	Gate"B"%
1回目	9	243,847	0.0037
2回目	10	236,128	0.0042
3回目	8	229,755	0.0035

(C)

Day 0



Day 18

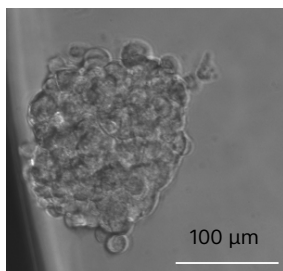


図1 セルソーターSH800Sを用いた希少細胞のカウント解析

- (A) 希少細胞ゲーティング解析。Jurkat細胞とMCF7の混合液のうちdebrisや死細胞を除外したゲート“A”を作成した。
- (B) ゲート“A”のうちEpCAM陽性CD45陰性集団にゲート“B”を作成した。
- (C) ゲート“B”に含まれるイベント数とその割合(N=3)を表にした。
- (D) ソーティングした単一細胞のスフェロイド培養 (Day0, Day18)

セルモーションイメージングシステムSI8000による単一細胞スフェロイド動き解析

3次元のスフェロイド培養は、2次元の単相培養と比較して生体内の状態により近いとされて、近年がん研究において広く用いられている。たとえば、がん幹細胞研究分野において、細胞表面マーカーの特定はまだまだ不十分なために、スフェロイド形成の有無ががん幹細胞の特定のひとつの手段となっている。また、薬剤感受性試験においてもスフェロイドへの感受性試験は、単相培養と比較して生体内により一層近い評価ができるとして、スフェロイドが研究対象として使用されている。

そこで、単一細胞ソーティング後に培養したMCF7スフェロイドに対して抗がん剤Doxorubicin (DOX) 100 μ Mを添加し、24時間の動きの定量解析をソニー製セルモーションイメージングシステムSI8000で行った(図2)。ここでのスフェロイドの動き解析は細胞内のオルガネラの動きを伴う細胞の微細運動の定量を示している。DOXを添加したスフェロイドは動き速度が時間依存的に低下し、非添加コントロール群と比較して20時間後以降に有意に低値であることが判明した。今回、動画像解析に用いたSI8000は細胞の動きを非染色かつ非侵襲で定量評価可能な解析システムであり、薬剤添加した非染色のスフェロイドの動き解析を行うことで、蛍光色素や前処理などによる影響を考慮せずに、組織を構成する細胞の生存性、薬剤感受性を評価することができる。このように、単一細胞からのスフェロイド形成の有無はがんの悪性度を判定する際のひとつの指標となり、こうした悪性度の高いがんに有効な抗がん剤のスクリーニングにも有用であることが示唆される。

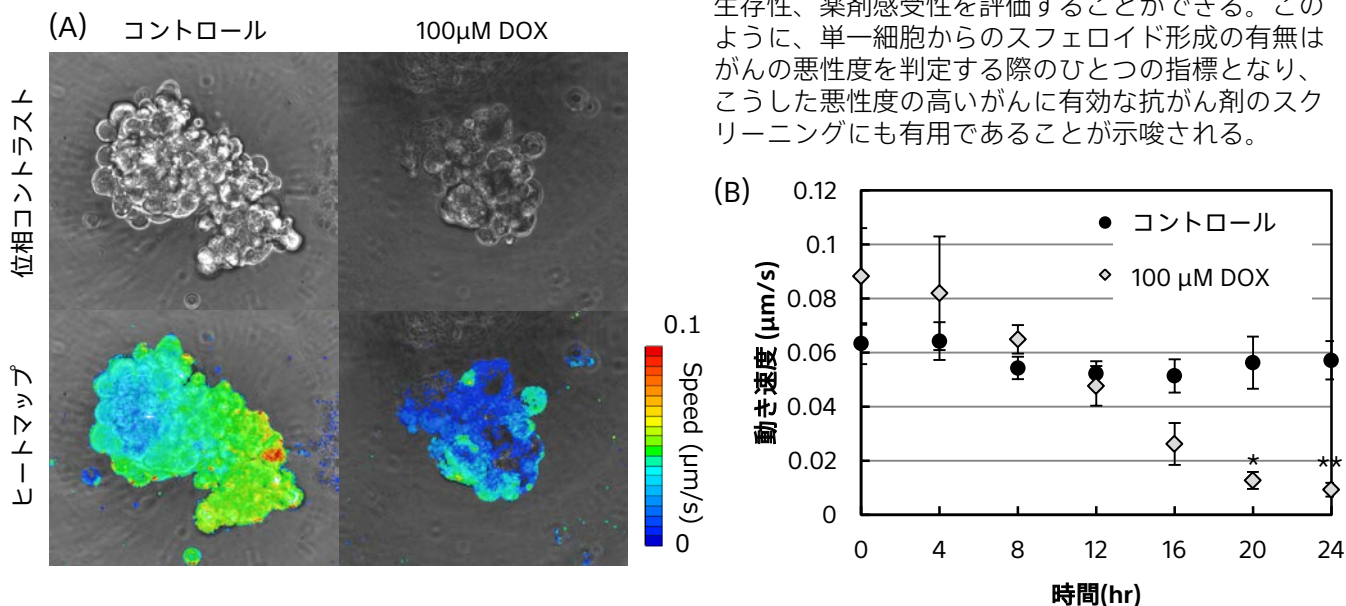


図2 セルモーションイメージングシステムSI8000を使った非染色/非侵襲抗がん剤添加評価

(A) DOX添加20時間後のスフェロイドの動き速度のヒートマップ。コントロールはDOX非添加群を表している。

(B) DOX添加後のスフェロイドの動き速度の時間変動解析結果 (N=5) を示した。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (共にコントロール比較時)

Cell Sorter SH800S

全自動セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

Compact Size - 小型 & 4レーザー

小型ながら最大4レーザー搭載可能で、前方散乱光、後方散乱光と合計6種類の蛍光を検出可能

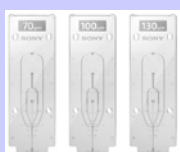
Automatic Setup - オペレーター不要の全自動設定

光軸調整、液滴形成、サイドストリーム調整、ディレイタイム決定を自動化し、手間のかかる設定作業が不要

Sorting Chip - コンタミネーションフリー

&メンテナンスフリー

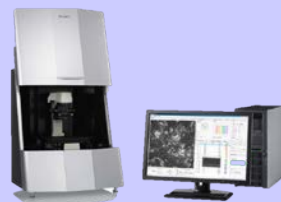
細胞の種類やアプリケーション(生存率、速度)に合わせて最適なチップを3種類のオリフィスサイズ(70/100/130 μ m)から選択可能



Cell Motion Imaging System SI8000

ソニー独自の動画像処理技術を応用した解析システム

- 高性能ビデオカメラで撮影したデータを解析するだけ
- 細胞・小型透明動物の動きを可視化、定量化
- 非侵襲・非染色での評価
- 使いやすいソフトウェア



ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部

〒243-0014 神奈川県厚木市旭町4-14-1
TEL: 0120-667-010 / FAX: 0120-388-060
MAIL: cytometry@sony.co.jp
http://www.sony.co.jp/LS

