

「シングルセルソート実験を成功させる実践Tips」 ソニー学術News プチコラム 第1号

目的株の樹立（クローニング）を行うため、いざシングルセルソート・再培養を始めてみたものの、「生存率や回収率をもう一声、向上させたい。ただ、そうした培養成績を改善するために、どの条件を検討すればよいか、わからない」といった経験はありませんか。

シングルセルソート後の細胞培養成績には、装置設定、ソート前後の細胞培養環境、ソート前の細胞の生理学的状態など、実に様々な要素が関与すると考えられています。そのため、シングルセルソートを真の意味で成功させるためのアプローチとしては、主に「装置設定の最適化」と「サンプル側の条件検討」の両側面が存在します。

「装置設定の最適化」について、具体的には、細胞サイズに適したノズル径の選択と、サンプルプレッシャー設定の検討が必要です。

まず、ノズル径の選択についてですが、ソニーのセルソーター(MA900/SH800)では、3種類のチップ（70 μ m/100 μ m/130 μ m）を展開しており、最適なチップを選択することで、生存率の向上が期待できます。これは、シース圧や液滴の落下速度（落下衝撃）などの違いが影響していると考えられます。詳細は以下のアプリケーションシートをご参照ください。

<https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/common/docs/app/sh800/09.pdf>

また、サンプルプレッシャー設定については、直接的に細胞生存率を向上させるというよりも、細胞の回収率を高め、結果的に細胞培養成績を向上させることを目的としています。目的細胞のサイズに適したサンプルプレッシャー設定は非常に重要です。液滴荷電方式のセルソーターでは一般的に知られていることですが、目的の細胞を含むべき液滴が、細胞を含まないままソートされる現象（Delayずれ※）が起こることがあるからです。（<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.a.20950>）

特に大径の細胞はDelayずれを起こしやすい傾向があり、細胞の大きさに対して適切なSample Pressureが設定されていない場合、ソート対象の液滴に細胞が乗り遅れてしまい、その結果、液滴が空の状態でソートされてしまうことがあります。そのため、回収される細胞の母数を増やすためにも、「その細胞を十分に押し流せるSample Pressure」を設定することが重要です。

一方、サンプル側の条件として、コレクションプレートの培地量の検討も、生存率向上に寄与する場合があります。社内観察結果によると、上述のアプリケーションシートでご紹介したような実験においても、48wellプレートと96wellプレートで同一実験を実施した結果、培地量が少ない96wellプレートの方が、生存率において良好だったことが確認されています。

これに関する作用機序は明らかになっていないものの、可能性の一つとして考えられるのは、各ウェルの培地量が、細胞由来の増殖因子や一部サイトカインの濃度に影響し、その結果として増殖能に差異を生じ得るというものです。そしてそれを裏付けるように、一部の細胞では、外因性の補助因子をコレクションプレートに添加する処理が、ソート後の生存率と生育率の向上に有効だったという例もあります。

また、細胞と共に装置に供するサンプルバッファーもPBSに限定する必要はなく、その細胞に適した液体培地のままロード・測定して構いません。細胞にとって適切なpH、浸透圧などの条件のものを使用することで、より良好な状態の細胞が回収されることが期待できます。

なお、実際には細胞種によって最適条件が異なるため、扱う細胞に応じた条件検討が求められます。とはいえ、検討時に意識すべきポイントはある程度まで絞ることができますので、本稿がその一助となれば幸いです。

※用語説明「Delayずれ」：目的細胞がレーザースポットで検出されてから、ソート液滴に乗るまでの時間差をSort Delayと呼びます。セルソーターでは、自動調整時にビーズを用いて設定したSort Delayと、目的細胞が流れてきたときのSort Delayにずれが生じることがあり、この現象をDelayずれと呼んでいます。（詳細はソニーの学術担当者にお問い合わせください。）

