ロボティクス技術が実現する抗体高産生株の取得
～ヤマハ発動機の細胞解析・単離システム～

Cell picking & imaging system

CELL HANDLER™

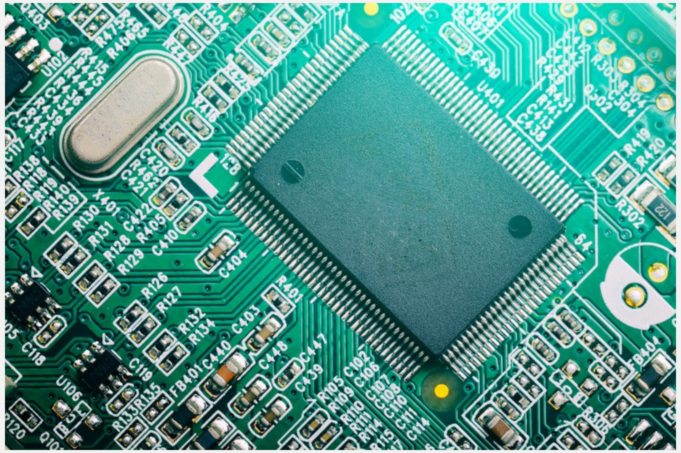
〇原田額郎[1], 田原 寛[2], 辻岡一也[2]
([1]ヤマハ発動機株式会社 新事業開発本部 MDB部,
[2]扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター 創薬研究部 バイオ医薬研究課)

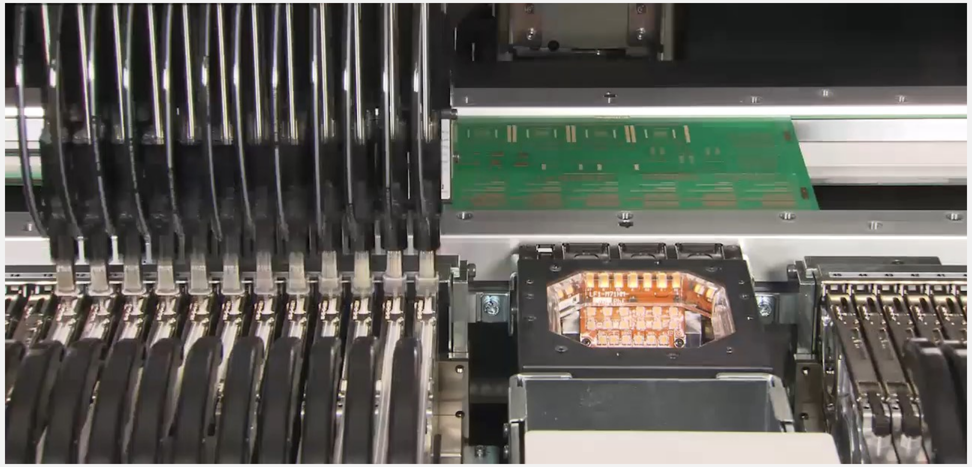
CELL HANDLER™の開発

ヤマハ発動機は、
オートバイやボート以外にも…

ヤマハ発動機のロボット技術

表面実装機(電子部品をプリント基板に実装するロボット) の技術がある
クラス世界最速を115,000CPH(Chip Per Hour)の搭載能力

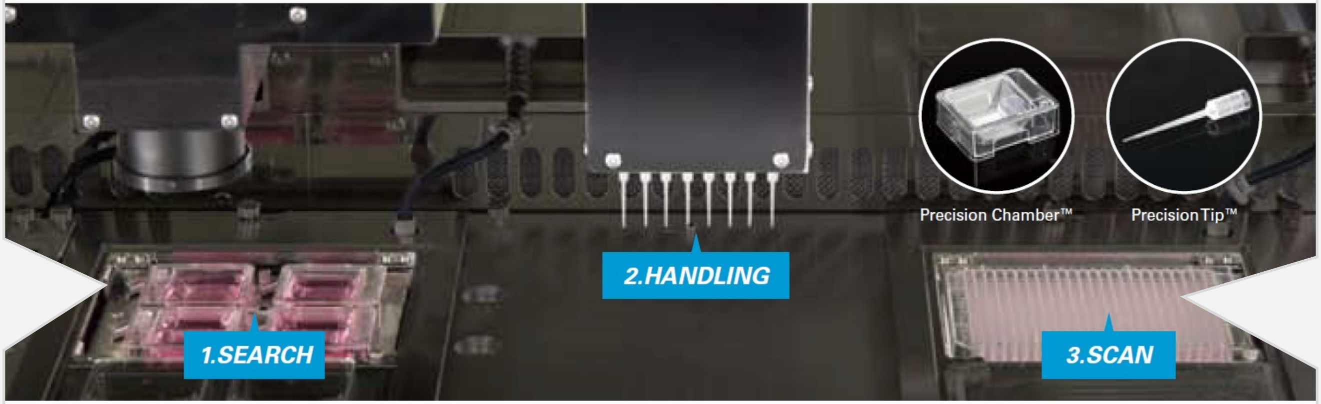




CELL HANDLER™

供給側容器

- SBS マイクロプレート (6-384well)
- カルチャーディッシュ
- 3D 培養容器
(Corning® Elplasia®、U bottom、V bottom)
- メチルセルロース



移動先容器

- SBS マイクロプレート(6-384well)
- MPS プレート
- PCR チューブ
- ゲルへのインジェクション

CELL HANDLER™

多様なサンプルに対応

3D オルガノイド/スフェロイド

ゲルドーム、メチルセルロース、浮遊

(がん細胞、iPS細胞、

心筋細胞、肺胞、腎臓 、小腸、etc..)

2D コロニー/シングルセル

(iPSコロニー、ES、CHO、hMSC、

ハイブリドーマ、血管新生細胞、etc..)

シングルセル

(がん細胞、iPS、免疫細胞、etc..)

名称	内容
Area(um2)	面積の指定をします。
Cell X(mm)	細胞のX座標の指定をします。
Cell Y(mm)	細胞のY座標の指定をします。
Cell Z(mm)	細胞のZ座標の指定をします。
Focus Image Num	何枚目でピントが合ったかを指定します。 ※指定枚数は1から始まります。
Focus Strongness	ピントの合い具合を指定します。
Major Dia.(um)	楕円近似した時の長径を指定します。
Minor Dia.(um)	楕円近似した時の短径を指定します。
Contlength	輪郭の長さを指定します。
Compactness	コンパクトネスを指定します。外周が起伏に富んでいるか否か。
Circularity	真円度を指定します。1.0が真円です。(≦1.0)
Gray Ave	輝度の平均値を指定します。
Gray Dev	輝度の分散値を指定します。輝度のばらつき。
Fluo IntensityA	蛍光強度を指定します。（Redフィルターを使用）
Fluo IntensityB	蛍光強度を指定します。（Greenフィルターを使用）
Fluo IntensityC	蛍光強度を指定します。（その他フィルターを使用）
Neighbor Dist.(um)	最も近い細胞との距離を指定します。
Cell Num	格子内の細胞の数を指定します。
ML Judge	機械学習による分類結果を指定します。(1:true、0:false)
ML Confidence(%)	MLによるtrue判定の信頼度を指定します。

CELL HANDLER™

多様なサンプルに対応

3D オルガノイド/スフェロイド

ゲルドーム、メチルセルロース、浮遊

(がん細胞、iPS細胞、

心筋細胞、肺胞、腎臓 、小腸、etc..)

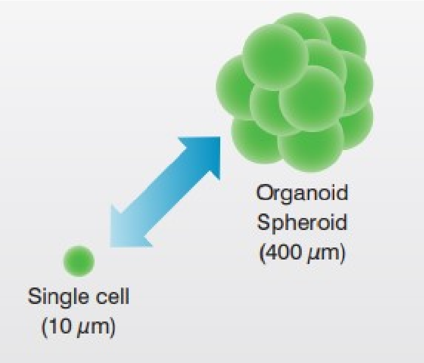
2D コロニー/シングルセル

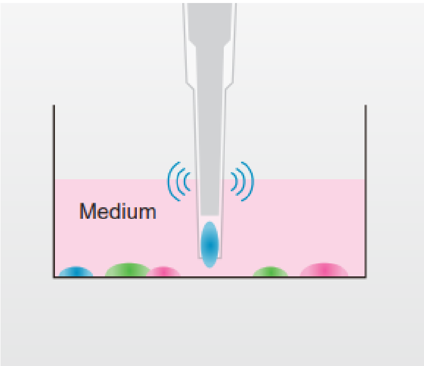
(iPSコロニー、ES、CHO、hMSC、

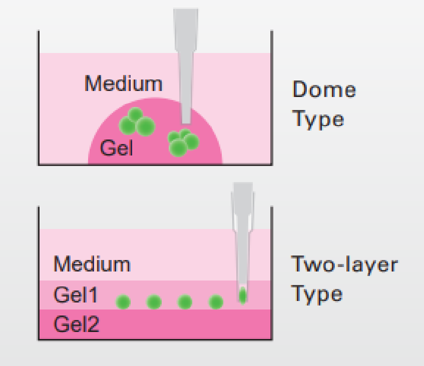
ハイブリドーマ、血管新生細胞、etc..)

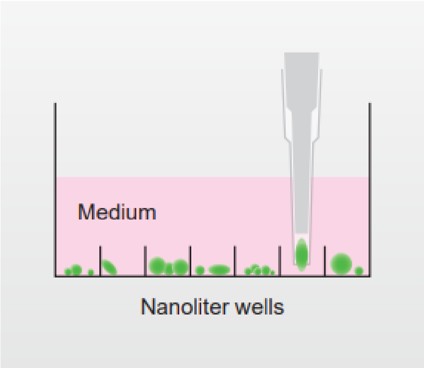
シングルセル

(がん細胞、iPS、免疫細胞、etc..)

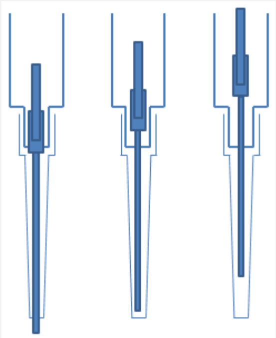








Precision Tip™

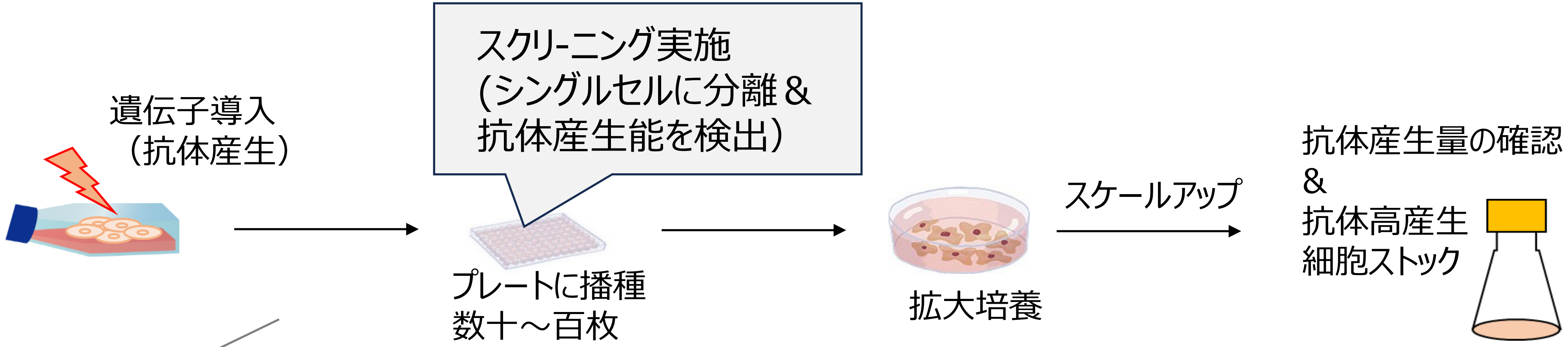


抗体産生細胞 取得プロセス

高効率かつシンプルな細胞単離法

従来法の課題

従来法の課題

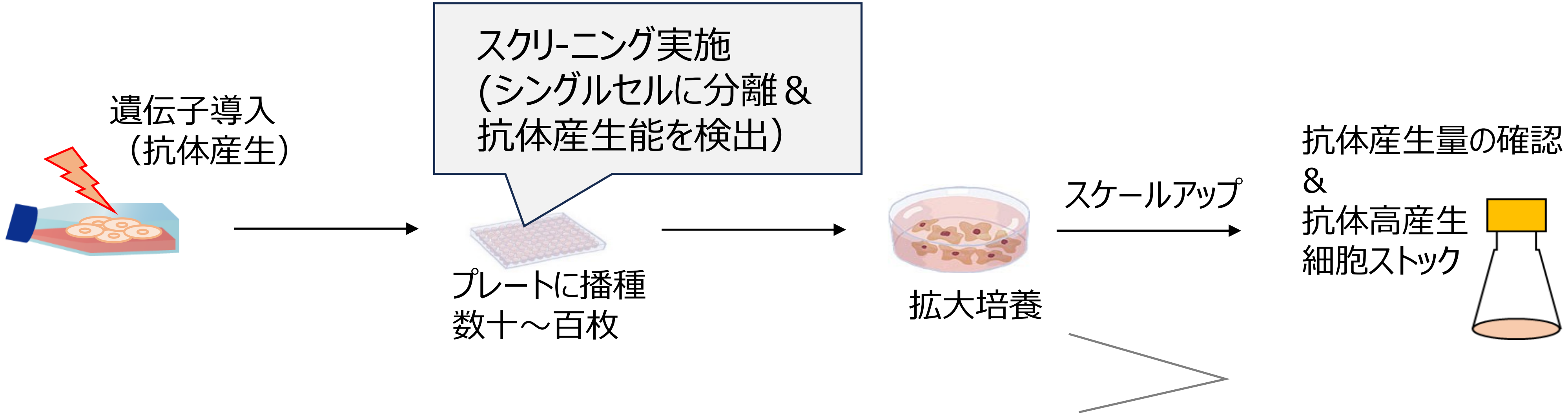


- ✓ **モノクロナリティ担保にかかるステップが煩雑**
- ✓ **シングルセルからの増殖率が低い**
- ✓ **スクリーニングに多くの作業工数、費用がかかる**

従来法の課題＜解決アプローチ＞

- ✓ **モノクロナリティ担保にかかるステップが煩雑** → **培養時・移動前後撮像にて簡単に担保**
- ✓ **シングルセルからの増殖率が低い** → **グリッド付プレート＋ゲル培地にて高い細胞増殖率を実現**
- ✓ **スクリーニングに多くの作業工数、費用がかかる** → **プレート2枚、全行程約2か月にて完了**

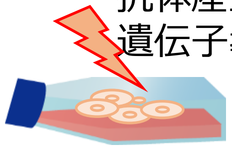
従来法の課題



✓ **抗体産生量は高くても増殖しにくい細胞が多い**

従来法の課題＜解決アプローチ＞

抗体産生
遺伝子導入



シングルセル培養
モノクロナリティ担保

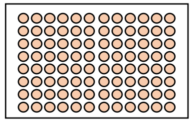
プレート**1枚**に播種

5日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）＆ピッキング

CELL HANDLER

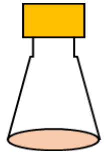
拡大培養



プレート**1枚**に播種

スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック



✓ **抗体産生量は高くても増殖しにくい細胞が多い**

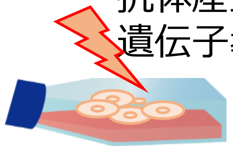
↓

極小培養環境下での培養法を用いることで、
細胞増殖率向上

新手法紹介

新手法：シングルセル化＆モノクロナリティ担保

YAMAHA
Revs Your Heart



抗体産生
遺伝子導入

シングルセル培養
モノクロナリティ担保

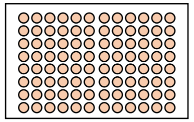
プレート**1枚**に播種

5日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

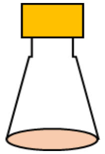
拡大培養



プレート**1枚**に播種

スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック



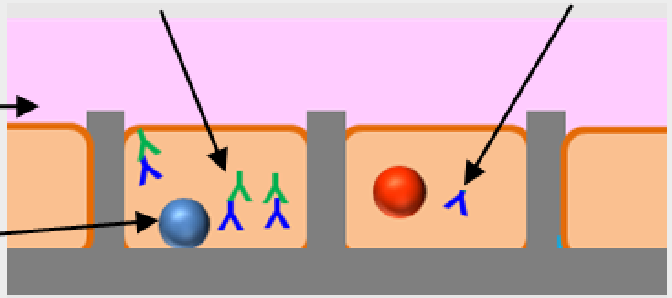
遺伝子導入細胞＋二次抗体、ゲルをグリッド付きプレートに播種

→細胞抗体発現評価をグリッド毎に実施可能

グリッドの数：
15,796個/1well

＝

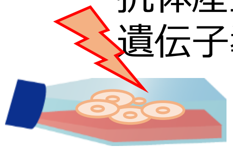
96wellプレート換算で
約**170枚**分！



→グリッド付きプレート1枚で96well plate1000枚分を用意可能、
シングルセル化工程を大幅に向上

新手法：シングルセル化＆モノクロナリティ担保

YAMAHA
Revs Your Heart



抗体産生
遺伝子導入

シングルセル培養
モノクロナリティ担保

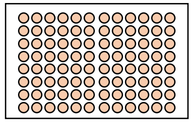
プレート**1枚**に播種

５日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

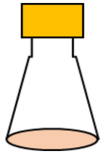
拡大培養



プレート**1枚**に播種

スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック

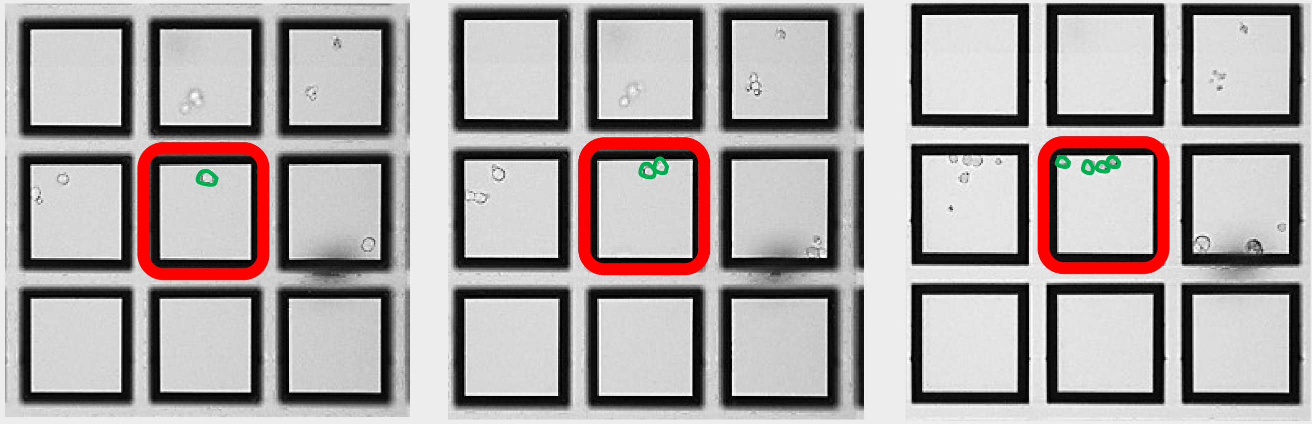


CELL HANDLER™による

日ごとの培養結果撮像

→**シングルセル由来**の証明

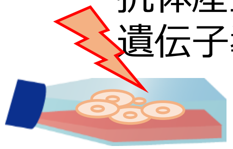
モノクロナリティ担保の確認



1日目　　2日目　　4日目

新手法：抗体産生量簡易検出＆細胞移動

抗体産生
遺伝子導入



シングルセル培養
モノクロナリティ担保

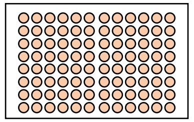
プレート**1枚**に播種

５日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）＆ピッキング

CELL HANDLER

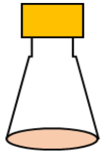
拡大培養



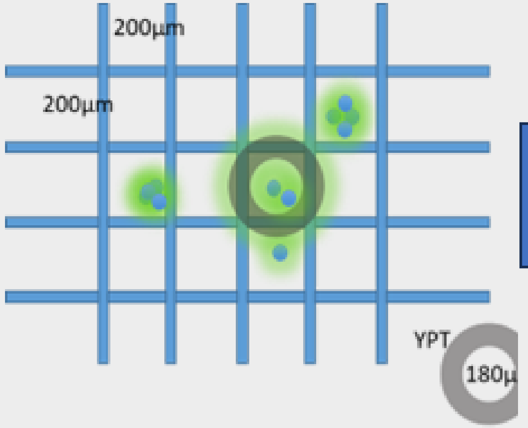
プレート**1枚**に播種

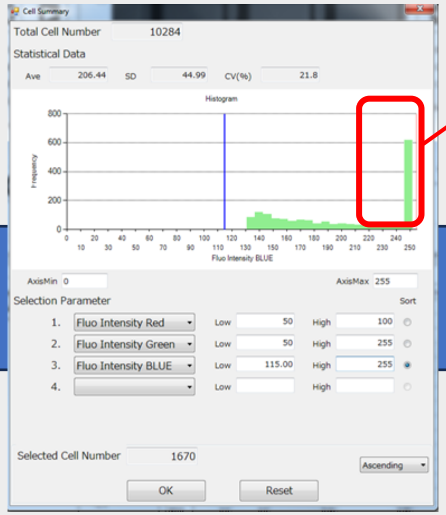
スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック

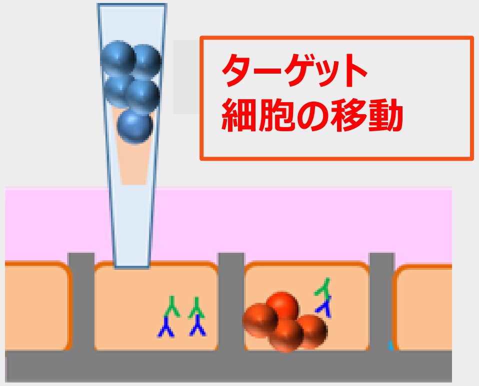


5日間培養後、蛍光ラベル化
二次抗体を指標として測定





**蛍光強度による順位付け
→ターゲット細胞の特定**



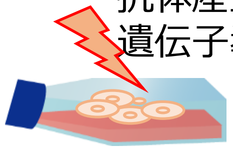
**ターゲット
細胞の移動**

蛍光強度が高い細胞を抗体高産生細胞として認識し、検出・ターゲット化

→ターゲット化した細胞をピッキングにより拡大培養用のプレートへ移動

新手法：抗体産生量簡易検出＆細胞移動

抗体産生
遺伝子導入



シングルセル培養
モノクロナリティ担保

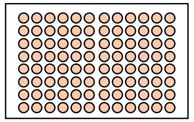
プレート**1枚**に播種

５日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）＆ピッキング

CELL HANDLER

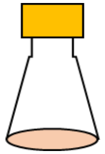
拡大培養



プレート**1枚**に播種

スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック



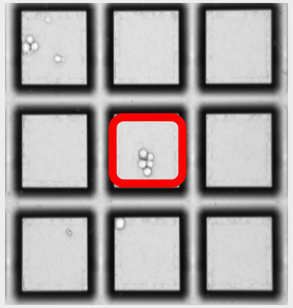
移動前後で撮像実施

→対象グリッド以外からの
細胞移動の有無を確認

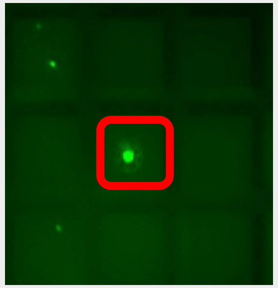
→**モノクロナリティ担保**
の確認

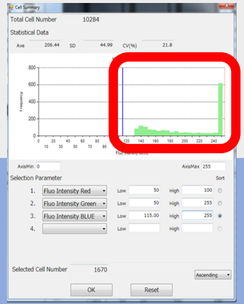
ピッキング前

明視野

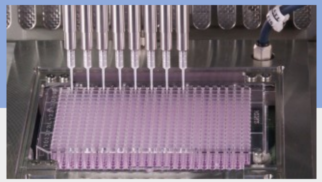


蛍光





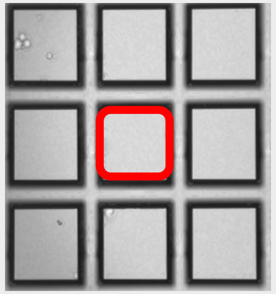
抗体産生量
を蛍光値を基に
自動検出



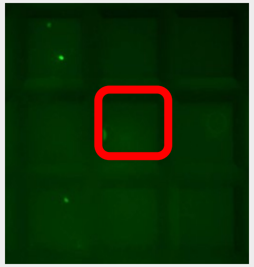
マルチプレート
へピッキング

ピッキング後

明視野

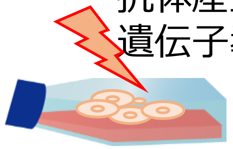


蛍光



新手法：極小培養環境下での拡大培養

YAMAHA
Revs Your Heart



抗体産生
遺伝子導入

シングルセル培養
モノクロナリティ担保

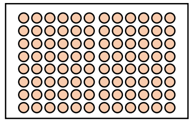
プレート**1枚**に播種

5日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

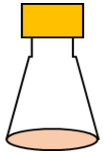
拡大培養



プレート**1枚**に播種

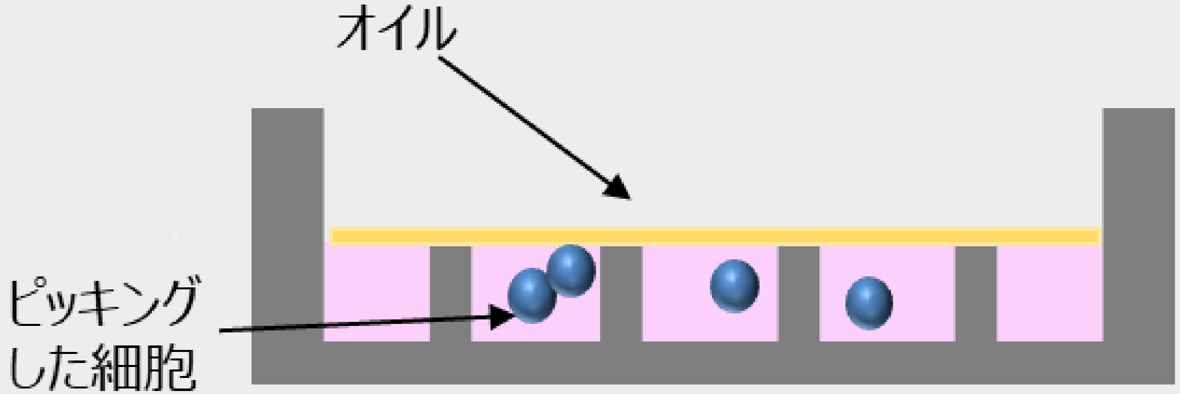
スケールアップ

抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック

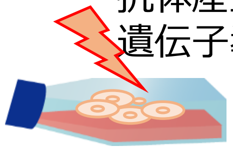


移動後の細胞をグリッド内に封入
オイル：培地の蒸発を阻止

→1グリッドあたり、約40nLという
極小培養環境を実現



新手法：極小培養環境下での拡大培養



抗体産生
遺伝子導入

シングルセル培養
モノクロナリティ担保

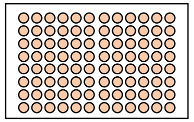
プレート**1枚**に播種

5日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

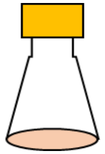
拡大培養



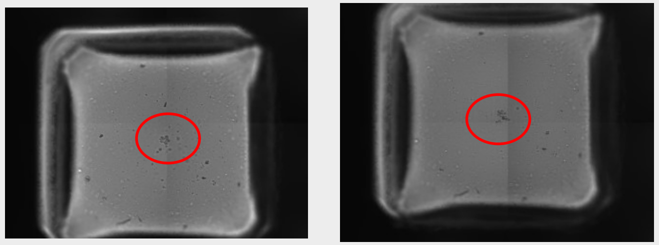
プレート**1枚**に播種

スケールアップ

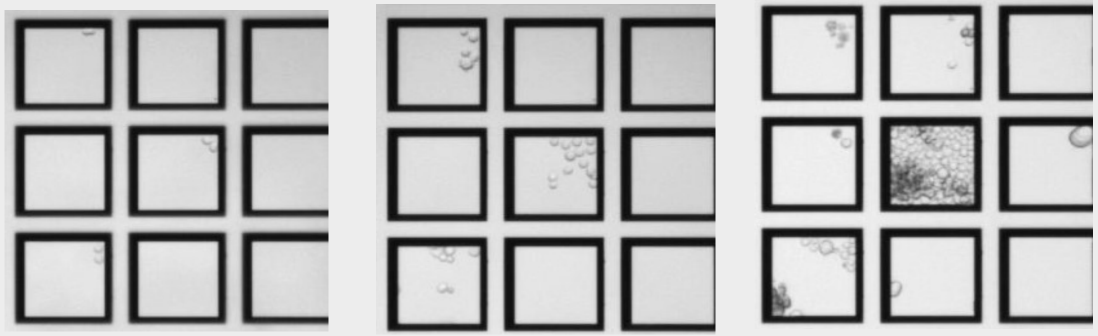
抗体産生量の確認＆
抗体高産生細胞ストック



増殖しない
1536 plate



1日目　**7日目**

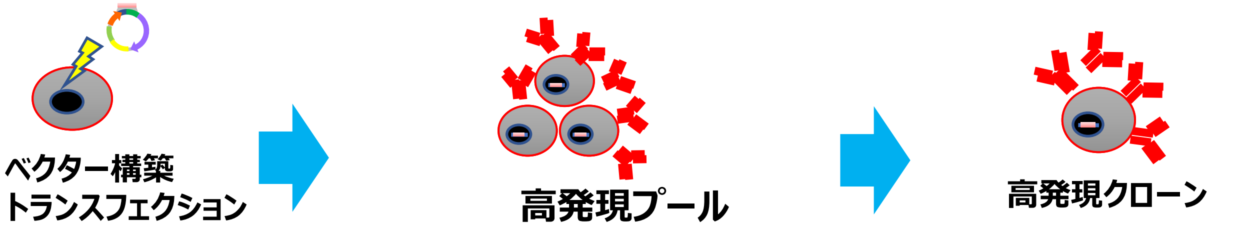


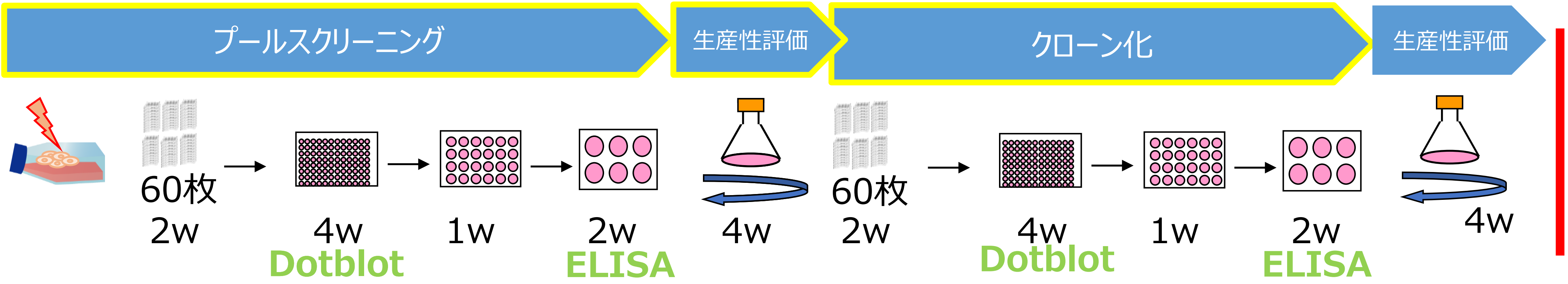
1日目　**4日目**　**11日目**

フィーダー細胞や血清やサイトカインなどの組換えタンパク質など増殖を促す成分が不要。

新手法：工数

【従来法】





【新手法】

・管理するプレート枚数の大幅削減

従来法：数十枚　→新手法：2枚

・凍結保存までの工数半減

従来法：約3~4ヵ月　→新手法：約2ヵ月

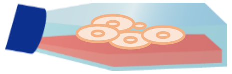
小括

- ✓ モノクロナリティ担保にかかるステップが煩雑→ **培養時、移動前後撮像**にて担保
- ✓ シングルセルからの増殖率が低い→ **グリッド付プレート＋ゲル培地**により、高い細胞増殖率を実現
- ✓ スクリーニングに多くの作業工数、費用がかかる→ **プレート2枚、全行程約2か月**で完了
- ✓ 抗体産生量は高くても増殖しにくい細胞が多々見られる→ **極小培養環境での培養**により、細胞増殖率向上

実例紹介①
リクローニング試験

実例紹介①（リクローニング試験：CHO-DG44＋IgG）

抗体産生量
確認済細胞



シングルセル培養
モノクロナリティ担保

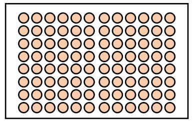
プレート**1枚**に播種

5日間培養

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

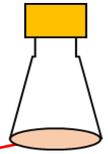
拡大培養



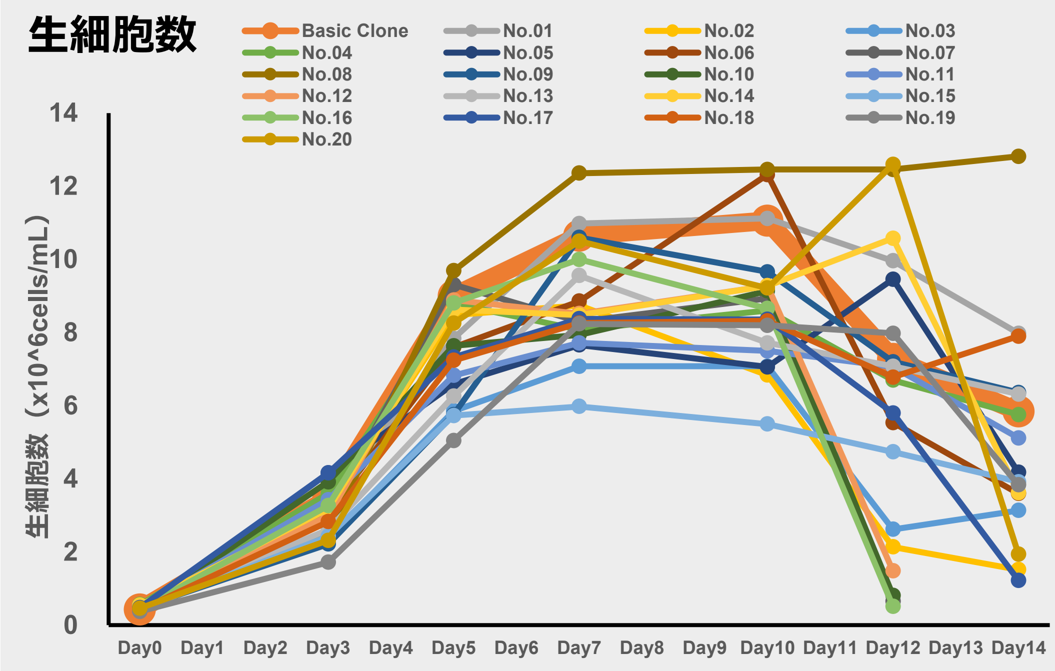
プレート**1枚**に播種

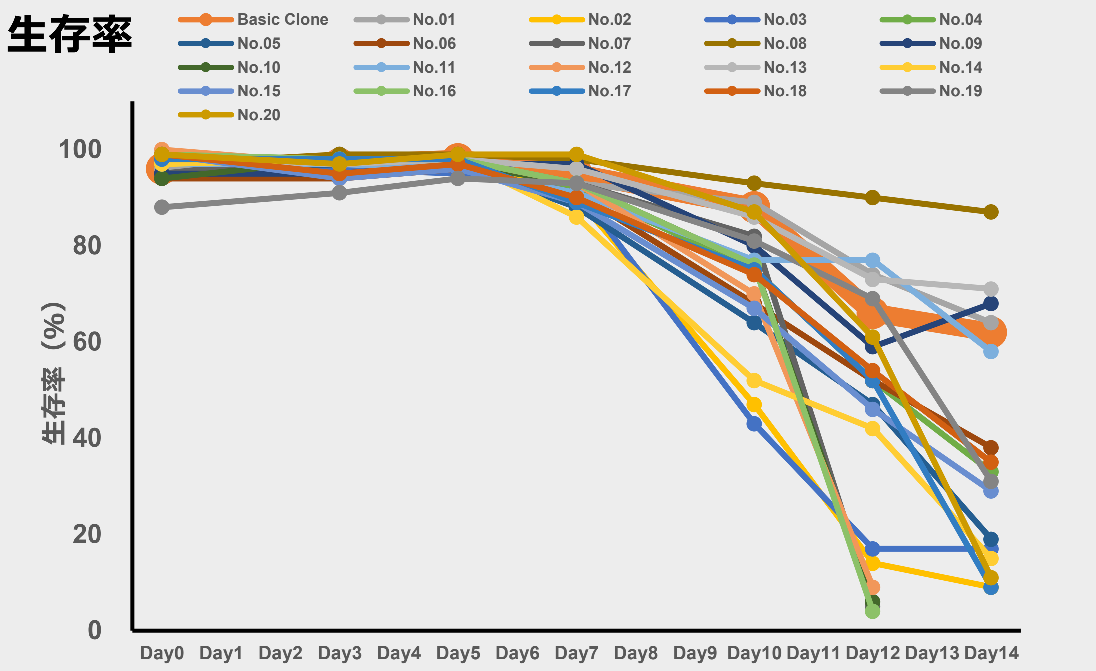
スケールアップ

抗体産生量の確認
（14日間Fed-batch培養後、ELISA）

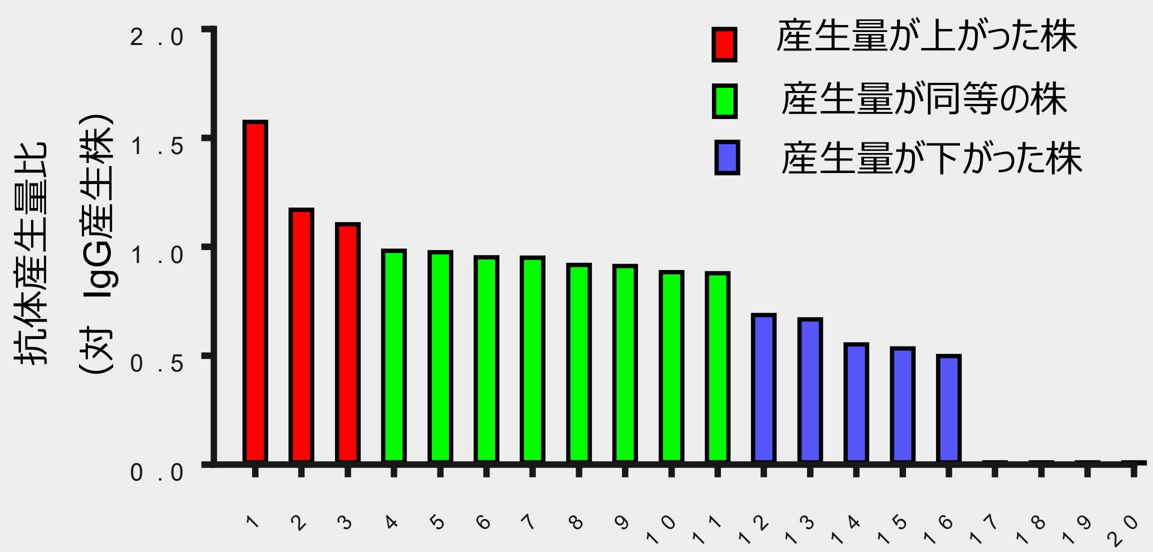


20株分取し、評価





実例紹介①（リクローニング試験：CHO-DG44＋IgG）



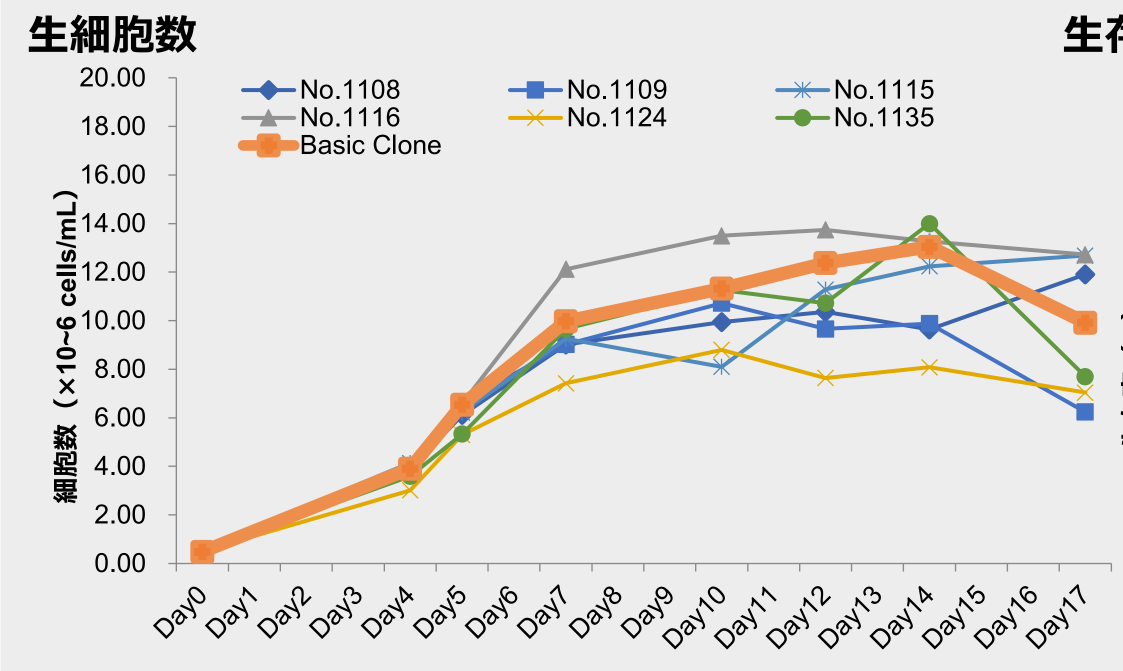
20株分取

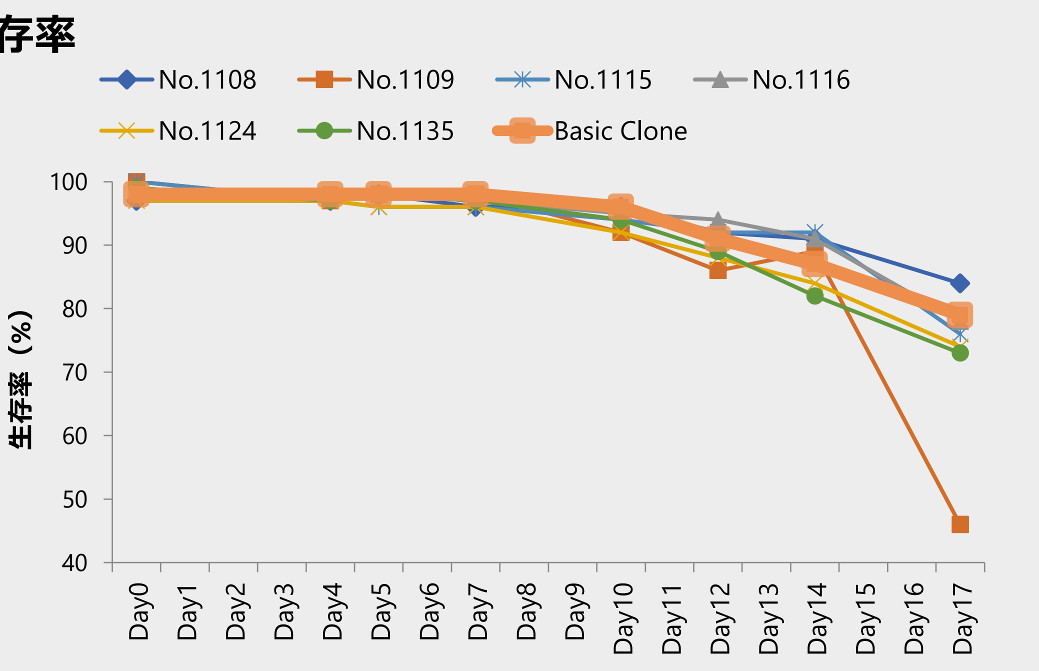
8 株(＃4-11の細胞) →産生量が同等

3 株 (#1- 3 の細胞) →１割以上
抗体産生量増大

実例紹介①（リクローニング試験：CHO-DG44＋Fc-protein）

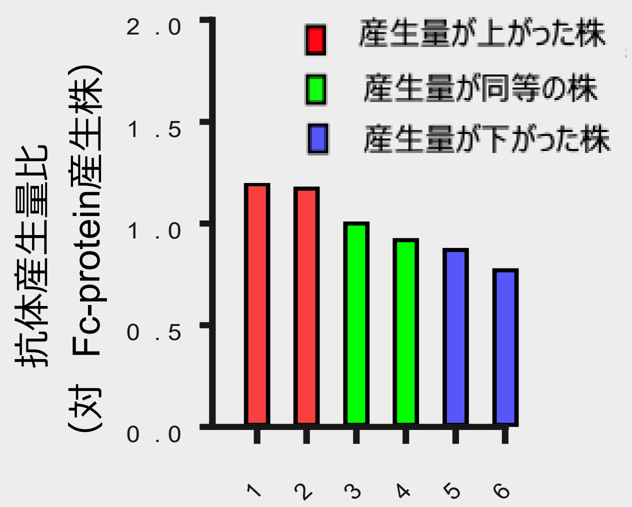
YAMAHA
Revs Your Heart





実例紹介①（リクローニング試験：CHO-DG44＋Fc-protein）

YAMAHA Revs Your Heart



6株分取

2株(＃3, 4の細胞) で産生量が同等

2株 (#1, 2の細胞) にて１割以上の抗体産生量増大

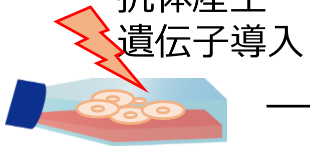
→リクローニング試験に適用できる。

実例紹介②
セルプール試験

実例紹介②（セルプールからの試験：CHO-DG44＋IgG）

YAMAHA
Revs Your Heart

抗体産生
遺伝子導入



→

シングルセル培養
モノクロナリティ担保

プレート**1枚**に播種

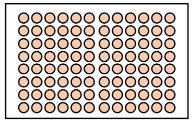
5日間培養 →

抗体産生量簡易検出
（蛍光）&ピッキング

CELL HANDLER

→

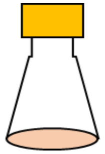
拡大培養



プレート**1枚**に播種

スケールアップ →

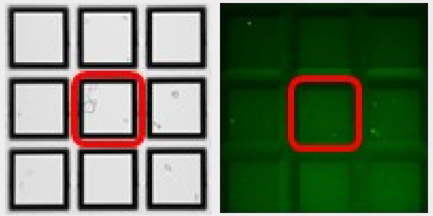
抗体産生量の確認
（3日間培養後、ELISA)



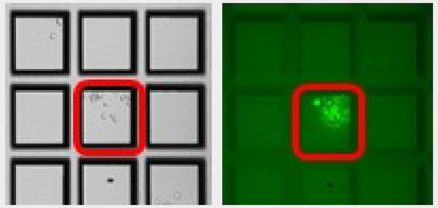
高蛍光細胞と低蛍光細胞を単離し、抗体産生性量測定

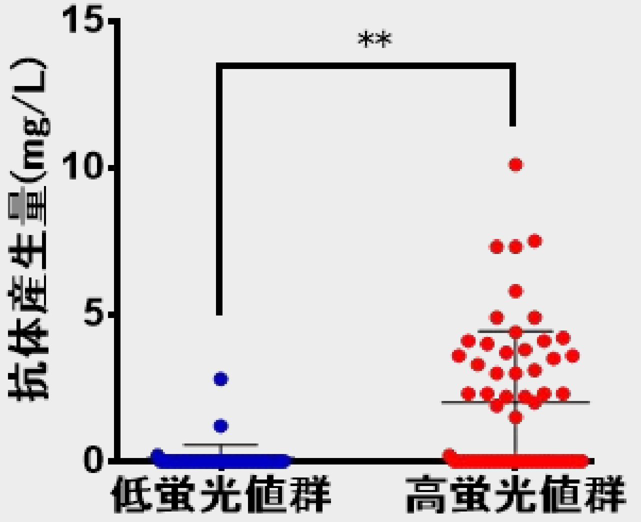
→２群間で抗体産生細胞数に有意な差を確認。

・**低蛍光細胞**



・**高蛍光細胞**

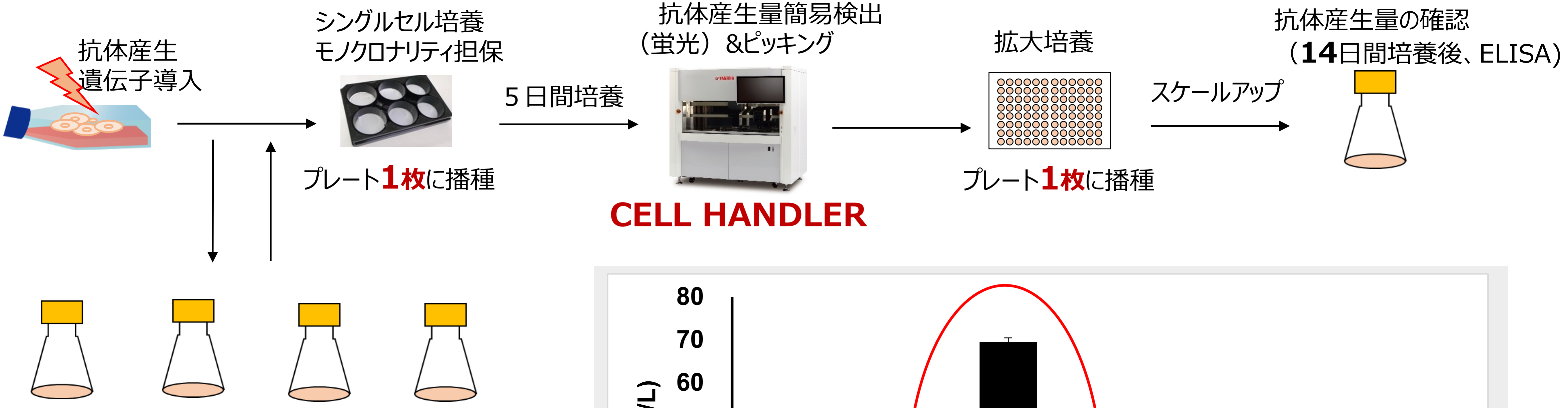




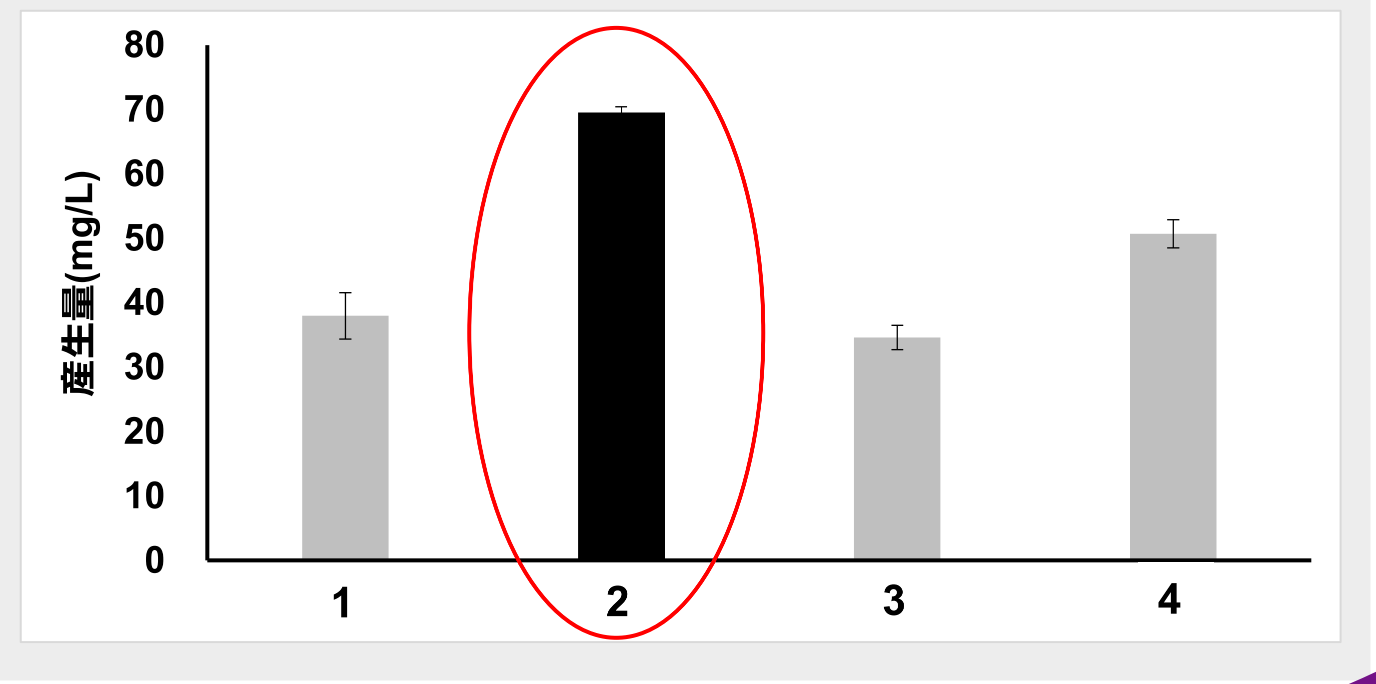
高蛍光群と低蛍光群における抗体産生量分布
（統計的有意性は、両側Student's t-testを用いて決定, ** $p < 0.01$）

実例紹介②（セルプールからの試験：CHO-S＋Fc-protein）

YAMAHA Revs Your Heart

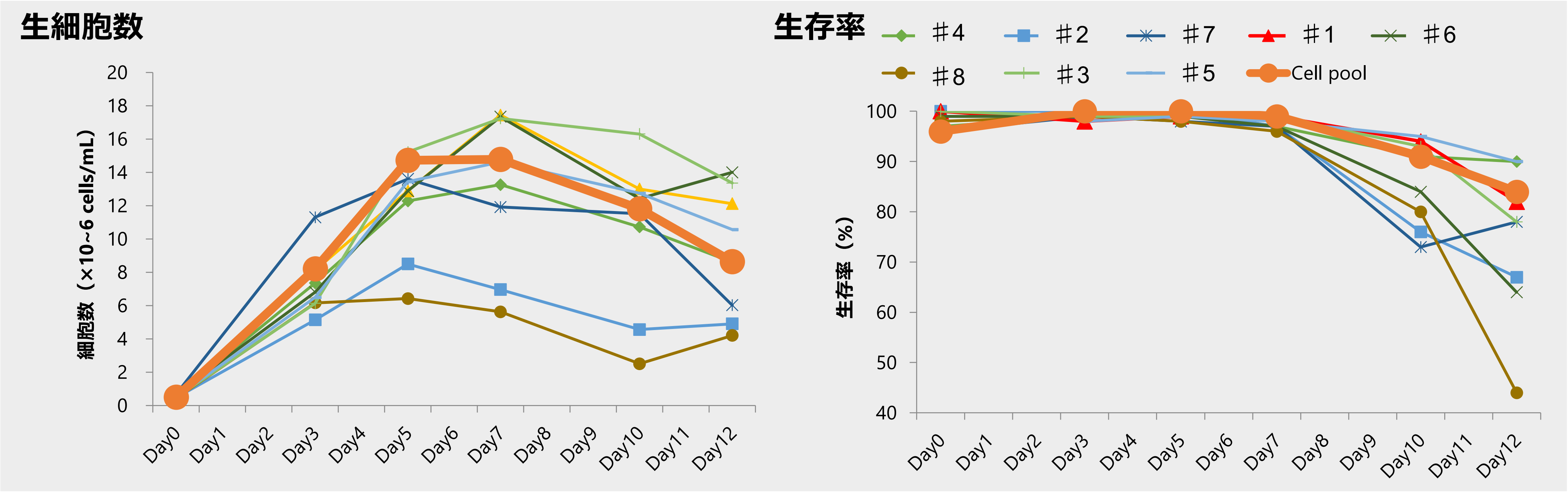


トランスフェクション後、4群に分け、
そのうち最も抗体産生量の高い群を使用

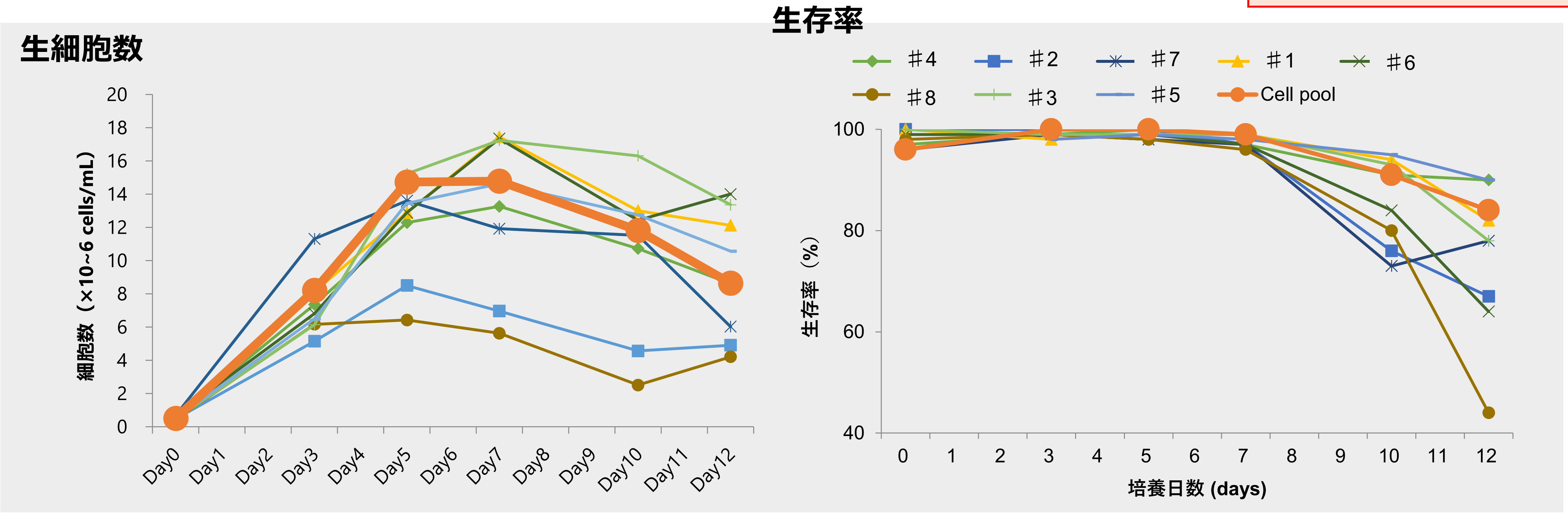


実例紹介②（セルプールからの試験：CHO-S＋Fc-protein）

YAMAHA
Revs Your Heart

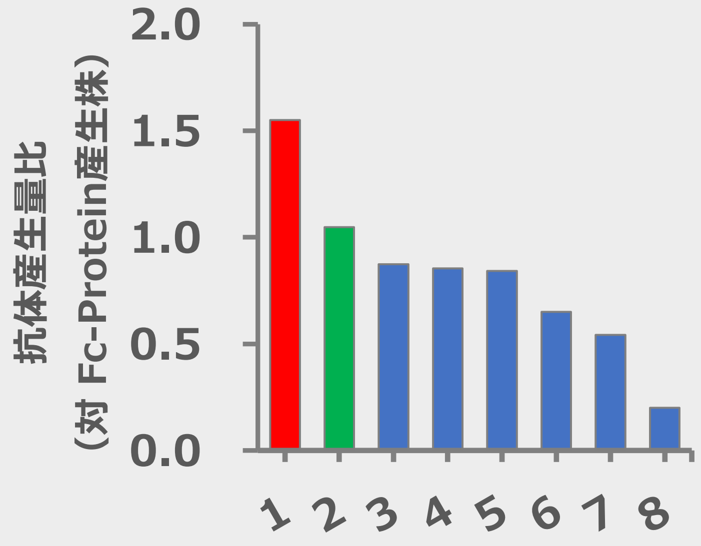


実例紹介②（セルプールからの試験：CHO-S＋Fc-protein）



実例紹介②（セルプールからの試験：CHO-S＋Fc-protein）

YAMAHA
Revs Your Heart



8株分取

1株(＃2の細胞) で産生量が同等

1株 (#1の細胞) にて5割以上の抗体産生量増大

総括

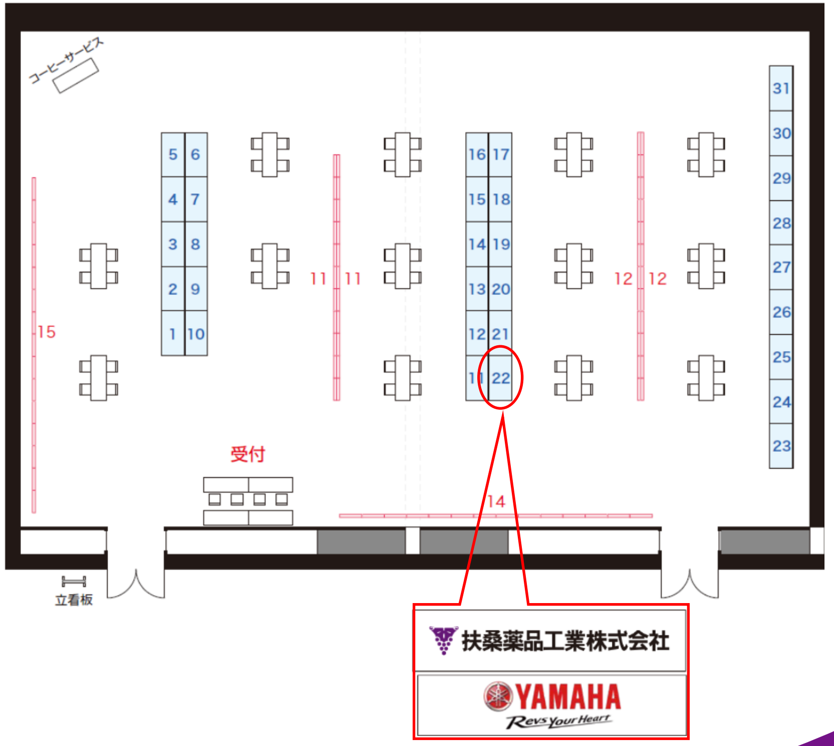
YAMAHA
Revs Your Heart

✓プレート2枚、工数2ヵ月での抗体産生株の単離が可能となった

✓リクローニング試験より、2ヵ月にて所有株の評価が可能であることが分かった

✓CHO-DG44, CHO-S株にて新手法を用いた抗体高産生株の単離に成功した

ご清聴いただきまして、ありがとうございました!

ブースへ是非お立ち寄りください！

<u>ポスター・展示会場　ブースNo.22</u>