

iPS細胞のコロニーピックアップ自動化の検討

上田杏菜¹, 伊藤三郎², 内海芳宣², 山下優美¹, 坂野香穂¹, 塚原正義¹
(¹京都大学iPS細胞研究財団, ²ヤマハ発動機株式会社)



【背景】

ヒト iPS 細胞の樹立時、もしくはゲノム編集などの遺伝子操作時において、細胞をクローン化後さらに、継代用/解析用に分割する必要がある。

我々は、自動化クローンピッカーを用い、継代培養を行いつつ、細胞の破壊検査を可能とするために同一コロニーをシングルセル化せずに三分割する方法を検討した。

【実験方法】

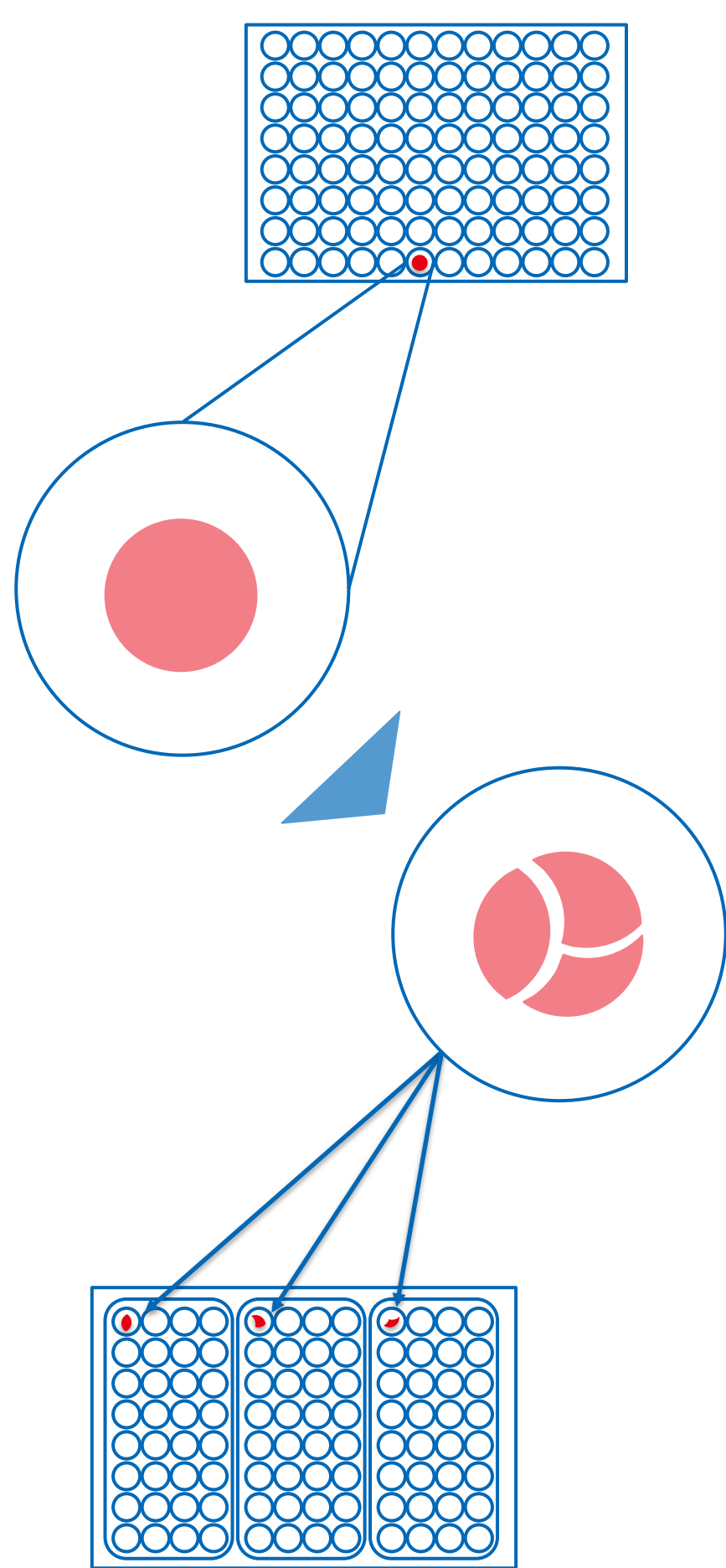
ヒトiPS細胞 (CFiS-S01) を96ウェルプレートにセルソーターでシングルセル播種し、培養

- ◆培養日数
① 12日
② 16日

↓
クローンピッカー (CELL HANDLER™) を用いてコロニーピックアップ

- ◆剥離条件
③ 無処理(EDTA-)
④ EDTA 5min間処理(EDTA+)

↓
3分割プレート (特注品) に播種
↓
約 1 週間後の生着状況を確認

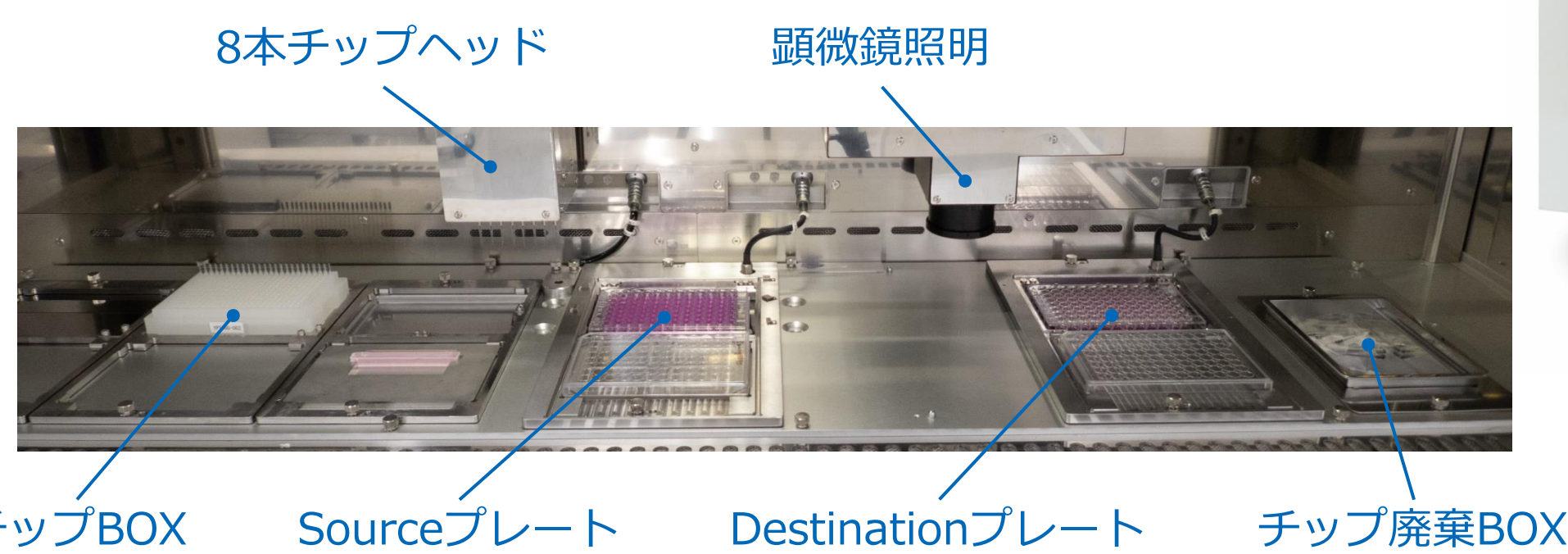


【CELL HANDLER™】

多様な目的サンプルを連続分取する全自動イメージング&ピックアップシステム



- 8本チップヘッドで高速細胞分取
- 高速撮影(①吸引前、②吸引後、③吐出後)、自動細胞解析
- 全作業データ自動保存
- チップ先端位置、培養器のバラツキ自動補正

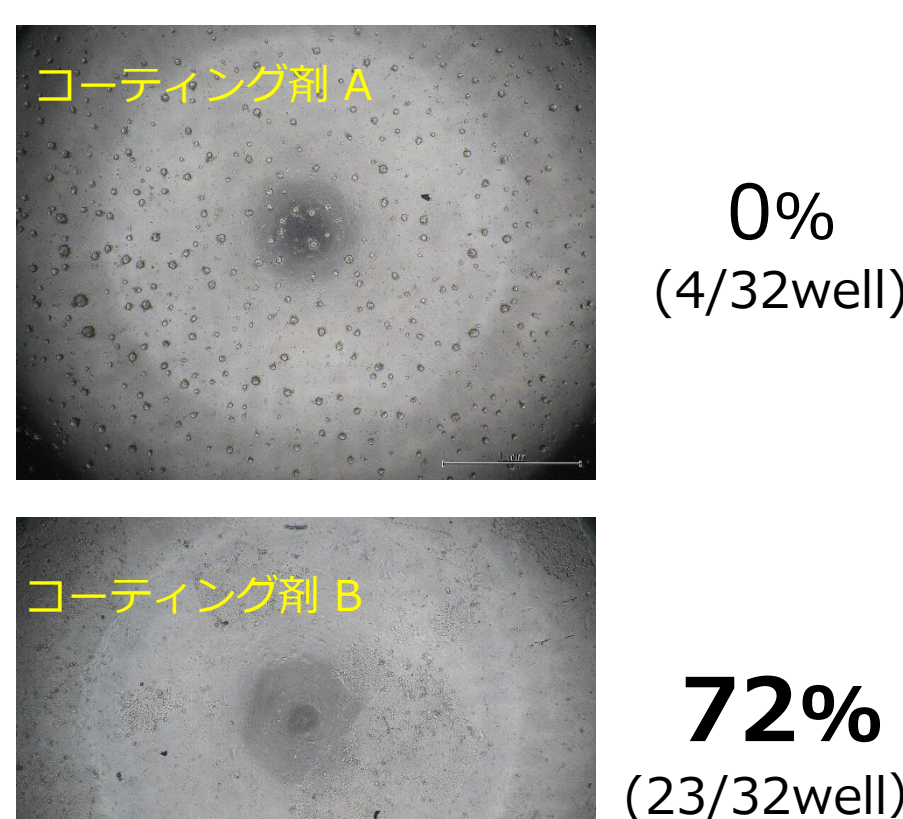


【3分割プレート】

- 分割プレートはアクリル板をくりぬき、底面にPET板を両面テープで接着
- 分割プレートのずれ防止にアクリル製の額縁プレートを外枠に両面テープで接着
- 外枠底面をくりぬき視認性UP
- ウェル底面プラズマ処理
- ガンマ線滅菌



コーティング方法



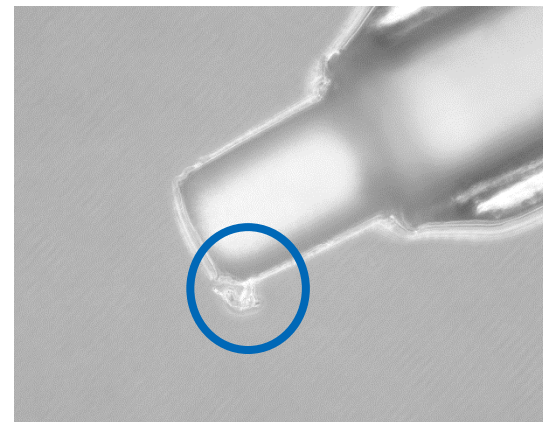
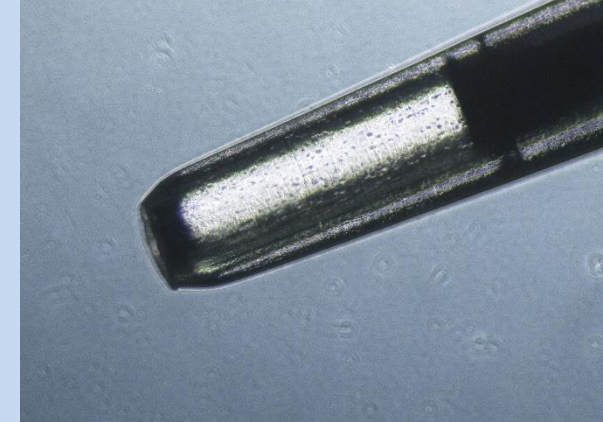
※手動で継代作業を実施。

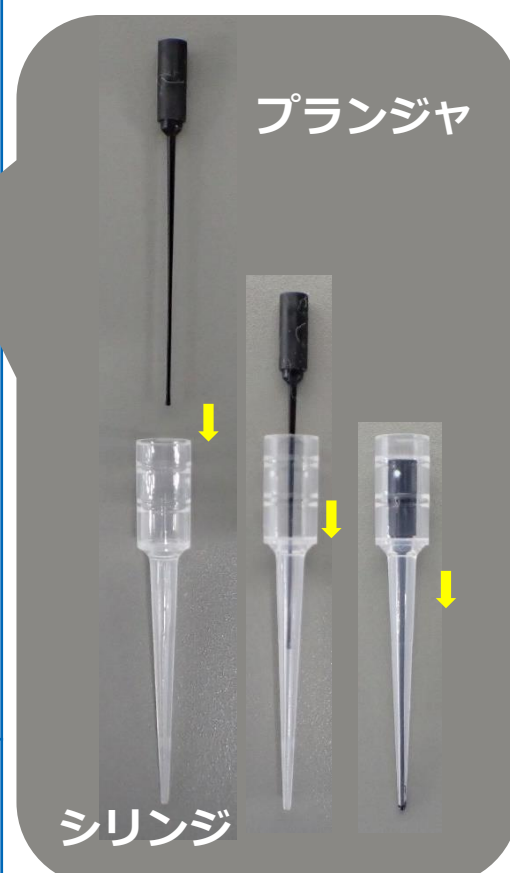
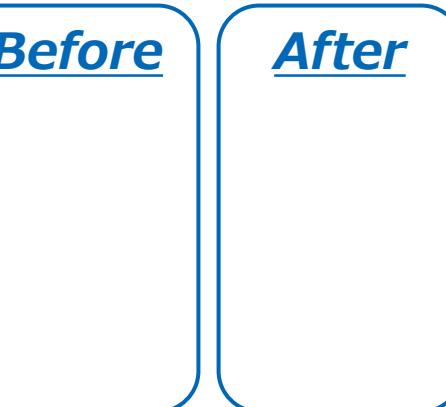
現物用意しております。
お手に取ってご覧ください。

【実験結果】

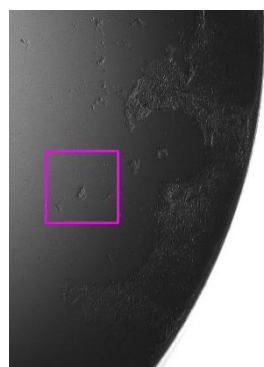
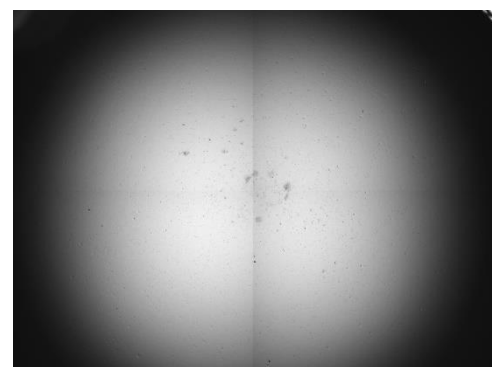
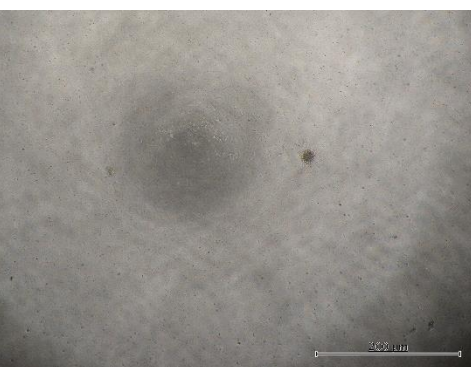
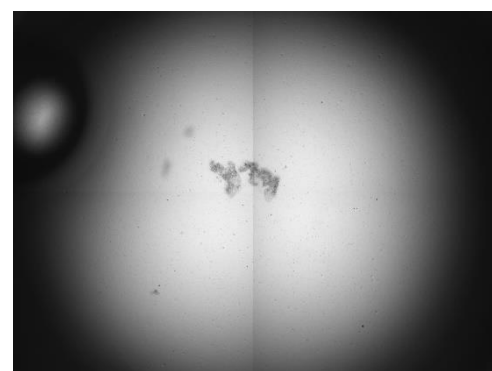
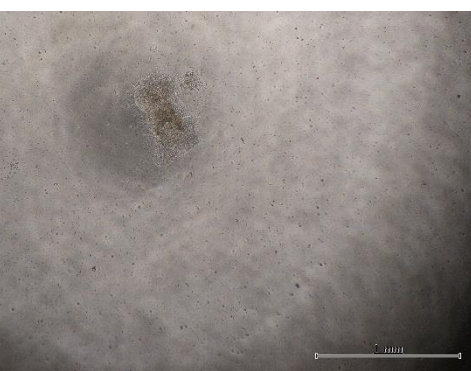
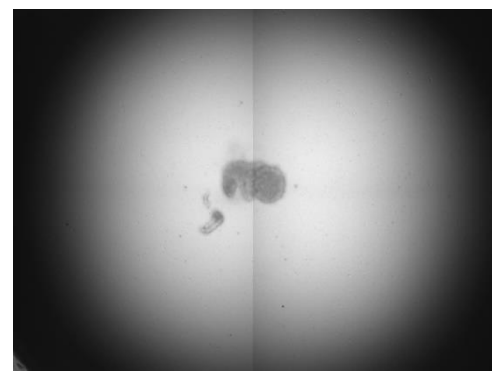
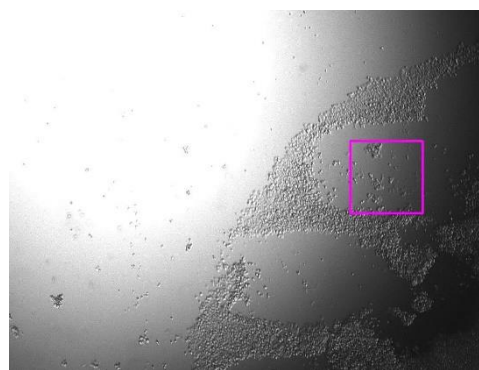
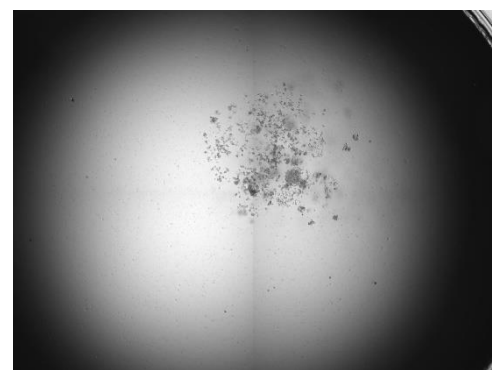
◆自動装置専用チップの改良

現物添付しております。
ご覧ください。

	Before	After
チップ形状	 ※作業直後の様子。 細胞片がチップ内外に付着	 ブランジャ/シリンジの密閉性向上
播種状況 (吐出先wellに細胞片を確認)	10% (3/30well)	100% (108/108well)
生着率 (1週間後の生着状況)	0% (0/30well)	36% (39/108well)



◆自動装置を用いた条件検討

培養日数	剥離条件	生着率	細胞写真	(左から順にPick直後、播種直後、培養後※)		
①12日	③EDTA-	6% (2/36well)				
	④EDTA+	17% (4/24well)				
②16日	③EDTA-	38% (9/24well)				
	④EDTA+	100% (24/24well)				

※①12日は播種後8日目、②16日は播種後4日目の様子

◆まとめ

- 分割プレートを用いることで、CELL HANDLER™での1対多の継代作業が可能となった。
 - 装置チップの性能向上により、iPS細胞のコロニーピックアップ作業が可能となった。
 - 十分に育ったiPS細胞コロニーに対してEDTA処理を行うことで、より効率的なコロニー分割作業が可能と示された。
- ✓ 分割プレートの材質等を検討することでさらなる生着率向上が期待される。

CELL HANDLER™を用いて市販のプレートに播種した場合

	①12日	②16日
③EDTA-	67% (12/18well)	88% (21/24well)
④EDTA+	72% (13/18well)	100% (24/24well)

【結論】

自動装置を用いてコロニーを分割して培養することが可能となった。これにより例えば、ゲノム編集株を継代培養用細胞と 2 種の解析用細胞 (例: FCM 解析とゲノム解析など) に調製することが可能になり、クローン化と解析に要する時間・労力を軽減できることが示された。