

## セルファンクション解析に必要な機器とその条件

Key words : セルファンクション、細胞内動態機能解析、IN Cell Analyzer 1000

はじめに

蛍光アプリケーション2003年9月号『pH感受性蛍光色素を用いたレセプター解析』(71-2137-91)には、読者のみなさまから多大な関心をお寄せいただきました。

そこで今回は、多くのお問合せを頂戴したセルファンクション解析について、弊社のセルファンクションイメージャーIN Cell Analyzer 1000(図1)を例にご紹介いたします。



図1. IN Cell Analyzer 1000

なぜセルファンクション解析なのか

ゲノム解析、プロテオーム解析の次に必要な研究のステップとしてセルファンクション解析が脚光を浴びています。セルファンクション解析は、ゲノム解析やプロテオーム解析により同定・精製されたさまざまな生理活性物質の働きを生細胞を用い

て検証することを目的としています。現在、同様の目的で広く用いられている各種顕微鏡の場合、多くの視野を獲得するのが難しく、さらに解析も自動化されていないため、多数のサンプルへの対応が不可能です。この点がゲノム/プロテオーム解析で得られた生理活性物質に対する機能解析のボトルネックとなっています。また、少数サンプルに関しても複数視野を観察し、客観性のあるデータを得ることは非常に重要です。そのため、顕微鏡レベルの解像度を持ち、なおかつ解析に有効なイメージおよび数値データを自動で獲得・解析できるシステムが求められています。

機器に要求されるスペック

前述の通り、セルファンクション解析は生細胞を用いて生理活性物質の機能解析を行う方法です。ひとつひとつの細胞が示す反応はそれぞれ異なるため、その現象を適切に捉えるためには多数のサンプルを解析し統計学的に有意なデータを得る必要があります。また、複数の生理活性物質を異なる条件下で検証、解析する場合も多く、反応条件を変え多くのサンプルを解析できる必要があります。そのために重要なポイントとして下記の項目があげられます。

大量のセルファンクション解析に必要な条件

- 高速かつ安定した測定
- 複数視野の自動検出
- 解析条件設定の簡略化および解析の自動化

高速かつ安定した測定

大量のサンプルを一度に培養、解析するためにはマイクロタイタープレートが適しています。一般的なプレートリーダーでは問題になりませんが、マイクロタイタープレートにはウェル内あるいはウェル間でプレート底面の厚みに違いがあります。このプレート底面の厚みの違いは、対象が微細な細胞であるセルファンクション解析システムスケールでは大きな差となり、検出毎の焦点調整が必要になります(図2)。このため、大量の細胞サンプルの解析には、迅速な焦点調整が必須です。IN Cell Analyzer 1000の場合、1プレートあたりでおよそ3分で測定が可能です(1視野/ウェル)。測定時間を細胞の継代作業などに抑えることで、細胞に対して与えるダメージを最小限に抑えられます。

A)



B)

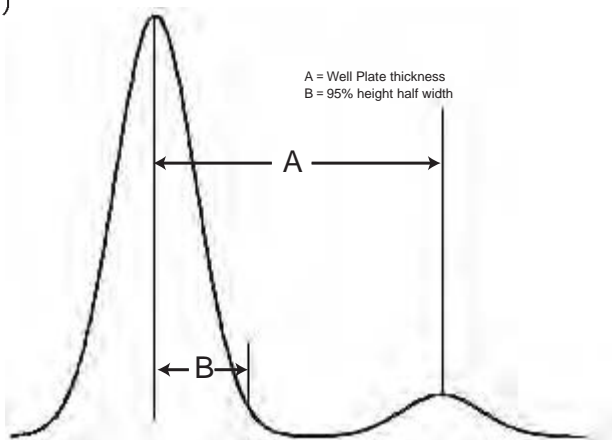


図2. IN Cell Analyzer 1000の共焦点レーザーオートフォーカスシステム (A) とその調整原理 (B)

検出部 (A ; 奥側) に接して設置したフォーカス装置により、高速な焦点調整が可能です。IN Cell Analyzer 1000は共焦点レーザーオートフォーカスの採用によりプレート底面からのレーザー反射光を読み取り、正確な焦点調節が可能になりました (B)。1 蛍光波長の場合 1 ウェル当たりおよそ2秒、96 ウェルマイクロタイタープレートでおよそ3分程度という高速なイメージ獲得を実現しました。

#### 複数視野の自動検出

生理活性物質に対する各細胞の反応は様々ではありません。そのため、複数の細胞を同時に観察し、統計学的に解析することが必須です。IN Cell Analyzer 1000では、複数視野の自動検出だけでなく、ランダムに測定ポイントを選択する機能が付いており、実験者による人為的な選択を排除することができます (図3)。

#### 解析条件設定の簡略化および解析の自動化

96ウェルプレートで自動獲得した大量のイメージを、これまで



図3. IN Cell Analyzer 1000の複数視野の観察機能

IN Cell Analyzer 1000は任意に指定した視野、または無作為に選んだ複数視野の選択が可能です。これにより、実験者による人為的な選択を排除することができ、より信頼度の高いデータを得ることができます。

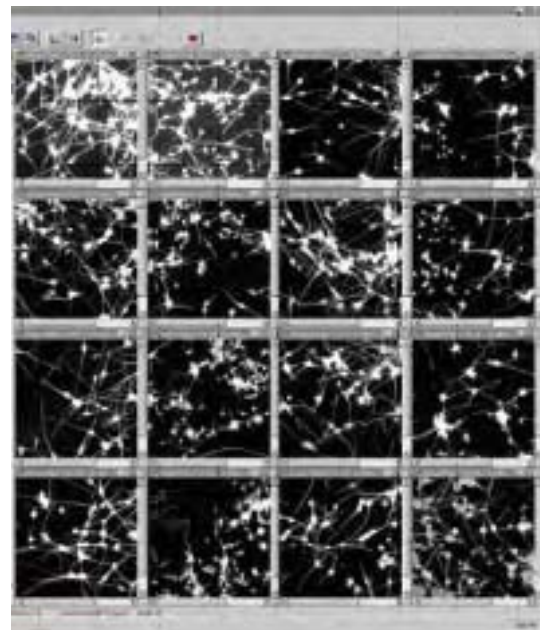


図4. 96ウェルプレートの細胞の一覧イメージ

検出した96枚の画像を並べて見ることができ、プレートの傷やノイズによるデータへの影響を実際のイメージで確認することができます。また、解析データの一覧から、画像データの呼び出しも可能なため、解析データとイメージ双方向からの確認が可能です。

のように解析することはきわめて時間のかかる困難な作業です。重要なポイントは、個々のデータについて検証することではなく全体の解析結果から統計学的に有意なデータを得ることです。特にサンプル数が多い解析の場合、実験者によるパラメーター入力を減らした状態で解析できることが理想です。またIN Cell Analyzer 1000では、肉眼による確認が必要な場合には、解析時に全ての画像を一覧表示させて数値だけではなく実際のイメージで解析データを検証することが可能です (図4)。

#### 生きた細胞を用いた解析を行うための条件

セルファンクション解析には当然生細胞を対象とした解析システムを用いるのが理想的です。しかしながら、現在の技術では細胞培養が可能な解析システムには大型化、複雑化が避けられません。

哺乳類由来の一般的な培養細胞の場合、細胞を維持するためには培養温度・CO<sub>2</sub>濃度・湿度を管理することが重要です。一般的な培養液はそれ自体に緩衝作用があるため、CO<sub>2</sub>ガスを供給しなくても短時間であればpHの変化による影響は軽減されます。湿度に関しても、検出時間が短時間であれば細胞へのダメージを最小限にとどめることができます。一方、細胞に一番影響を与える温度変化については、温度コントロールユニットを使用することで、生細胞の測定にも対応することができます。

#### セルファンクションイメージャーの今後

今後、細胞内における生体分子の動態・機能あるいは活性を解析するためのアプリケーション開発へのニーズは高まるものと予想されます。特に、生理活性物質の添加により細胞が示す経時変化の解析機能は、さまざまな場面での応用が期待されます。そのようなアプリケーションに対応するために、サンプルインジェクターとカイネティクス解析ソフトウェアが近日登場の予定です。短/中時間を要する解析には温度コントロールユニットを、さらに長時間培養を要する解析にはロボットとインキュベーターを組合せることで生細胞を大量に観察解析するといった、細胞を用いた包括的な研究を展開することが可能になります。セルファンクション解析は近年脚光をあびはじめた新しい分野ですが、専用の試薬や機器の登場により、今後生命科学研究における中心的な実験手法の一つになることが期待されます。

### GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。