FDSS/μCELL アプリケーションカタログ

Cellular Dynamics international
a FUJIFILM company

iPS細胞由来心筋細胞の Ca^{2+} トランジェントの測定と解析

化合物の薬効・安全性の評価

HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS

iPS細胞を応用した創薬とFDSS

近年、iPS細胞（人工多能性幹細胞）の開発が創薬の分野に大きなインパクトを与えました。実際に、ヒトiPS細胞由来の各種ヒト細胞が国内外数社から発売され、大量評価が可能な状況になってきており、今後は薬効評価や安全性試験など、創薬分野への応用が期待されます。 実際に、化合物の有効性や安全性をiPS細胞由来心筋細胞を用いて評価する試みが始まっていますが、このような評価実験、特に前臨床試験よりも早期の段階における評価実験においては、簡便かつハイスループットおよび低コストな評価方法が求められています。
浜松ホトニクスでは、ヒト心筋細胞の収縮時の細胞質内のカルシウムイオン濃度変化（Ca^{2+}トランジェント）をカルシウム感受性蛍光色素により測定してその波形を解析する方法により、化合物の有効性や安全性のハイスループット評価を可能とするFDSS/μCELLの新機能を開発しました。 今後、FDSS/μCELLは、実績ある創薬スクリーニング用途に加えて、ヒトiPS細胞由来心筋細胞（hiPSC-CM）を使用した化合物の毒性評価用途でもご使用いただけると考えられます。

FDSS®/μCELLの紹介

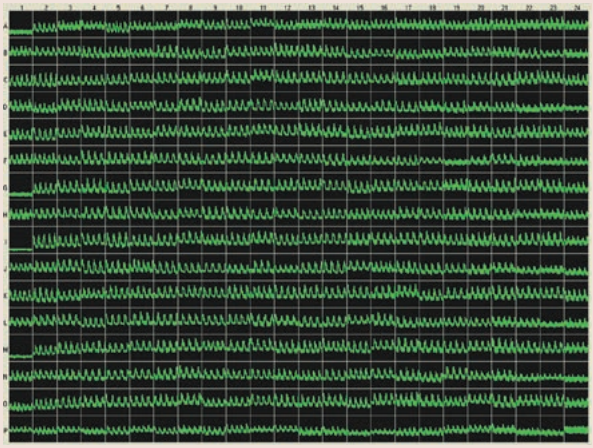
FDSS/μCELLは、96/384ch対応の全ウエル同時分注・同時測定型マイクロプレートリーダです。
異なる種類や濃度の試薬を全ウエル同時に分注し、蛍光・発光の時間変化を全ウエル同時に測定できます。ウエル間に測定時間差が生じないため、生細胞を均一条件で測定することができます。創薬スクリーニング分野で培った技術をコンパクトに集約し、1台で創薬スクリーニング用途と研究用途の両方にご使用いただけます。

特長

- ●小型で低価格、簡単操作
- ●96/384全ウエルに同時分注、同時測定
- ●全ウエルを均一に検出可能な専用光学系
- ●長寿命・高安定なLED励起光源
- ●2波長蛍光発光の同時測定も可能（オプション）

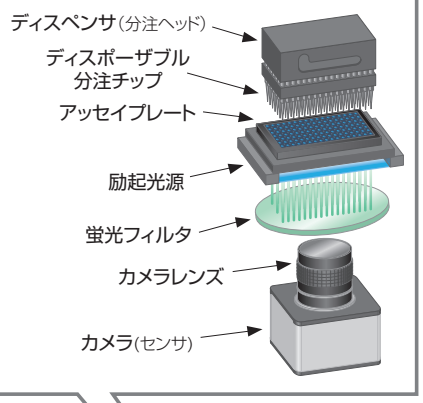
iPS細胞由来心筋細胞内Ca^{2+}測定

Cell：iCell® Cardiomyocytes （Cellular Dynamics International）
Probe：Fluo-8 AM



96/384ウエルフォーマットでiPS細胞由来心筋細胞のカルシウムイオン濃度変化を測定することが可能です。
上図は384ウエルフォーマット

【FDSS/μCELLの概略図】



新機能

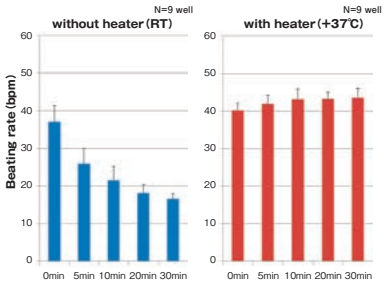
●心筋細胞の拍動を安定的に保つ温度制御
●高速データ取得によるより正確な波形解析

FDSS/μCELLを使用して、信頼性の高い評価系を構築するための新機能を開発しました。下記3つのオプションを搭載したFDSS/μCELLを用いることで、iPSC-CMを用いた化合物の心毒性評価を安定かつ効率的に実施することが可能です。

新オプション①

ヒータユニット A11529-14

FDSS/μCELLのアッセイプレートホルダ近傍を+35 ℃～+37 ℃に保温する専用のヒータユニットです。 iPSC-CMは周囲の温度変化の影響を受けて拍動数が顕著に変化するため、拍動数を生理的環境下にて一定にすることが実験を行う上で重要です。ヒータと内部温度センサを追加することで、より体内に近い条件下でiPSC-CMを安定的に測定することが可能です。



Cell: iCell® Cardiomyocytes (Cellular Dynamics International)

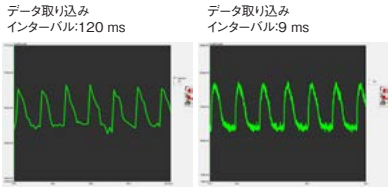
iPS細胞由来心筋細胞の拍動数に対するヒータユニットの効果

マイクロプレート内の細胞を、CO_2インキュベータ内での染色後直ちにFDSS/μCELLで測定し、Ca^{2+}変動のピーク回数から拍動数を求めました。
ヒータユニットが無い場合、拍動数が時間経過とともに低下したのに対し、ヒータユニットを使用した場合には、30分経過後においても拍動数が維持できました。

新オプション②

FDSSソフトウエアオプション 高速データ取り込み機能 U8524-11

FDSS/μCELLで非常に短いインターバルで測定データを取り込む専用ソフトウエアと高速高感度センサのパッケージです。iPSC-CM内Ca^{2+}トランジェントを詳細に解析するためには、高頻度な測定データの取り込みが重要です。本オプションにより、ミリ秒単位の速さで生じるiPSC-CM内Ca^{2+}濃度変化を従来より正確に評価することが可能です。



iPS細胞由来心筋細胞内カルシウムイオン変動の高速データ取り込み

データ取り込みインターバル8 msでの高速データ取り込みでは、100 msでの取り込み時と比較してCa^{2+}濃度上昇の立ち上がりやボトム値に対するピーク値、単位時間あたりのピーク数などを、より正確に取得することが可能です。
取得データは、Ca^{2+}濃度変化の詳細解析に有用です。

新オプション③

FDSSソフトウエアオプション 波形解析機能（心筋用） U8524-12

FDSS/μCELLで取得した複数ピークの解析に有効な専用ソフトウエアです。細胞内Ca^{2+}トランジェントに伴う蛍光輝度変化の波形解析には手間のかかる作業が多く、簡便な処理が必要とされていました。本ソフトウエアにより、波形解析を自動化することで、複数の波形を迅速に処理することが可能です。

※正確な解析には、新オプション②「FDSSソフトウエアオプション 高速データ取り込み機能 U8524-11」が必要です。

FDSSソフトウエアオプション 波形解析機能（心筋用）表示画面例

本ソフトウエアは、FDSSソフトウエアから起動します。FDSS/μCELLで取得した96/384ウエルフォーマットの測定データについて、手動・自動で解析条件を設定した後、16項目の解析が可能です。

波形解析用ソフトウエア

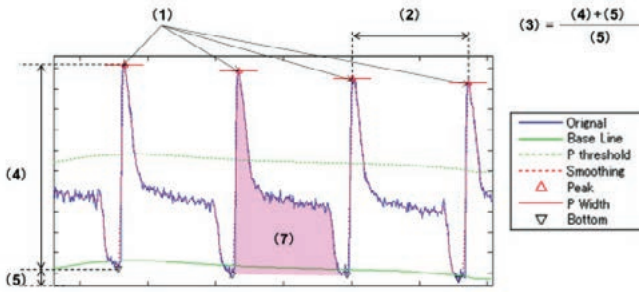
iPSC-CM内Ca^{2+}トランジェントの複数ピークを迅速・簡便に解析でき、手間のかかる波形の読み取りや解析作業を強力にサポートします。

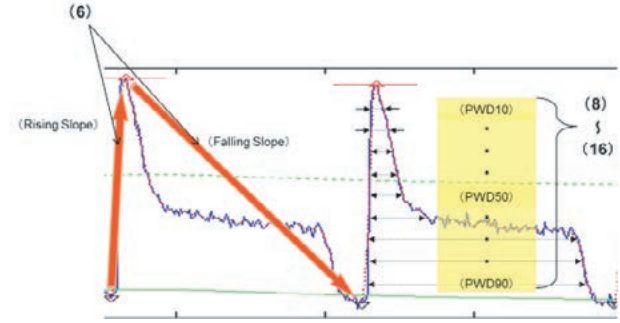
特長

- ●細胞内Ca^{2+}変動を迅速に可視化、解析
- ●解析条件の自動取得や視覚的なセットアップが可能で使いやすい
- ●柔軟なデータ処理、条件設定により、様々な波形解析に対応
- ●16項目の解析が可能で、iPSC-CMの評価を総合的にサポート

解析項目

(1)	**Peak number（Total, BPM）** 検出ピークの数
(2)	**P-P time [ms]（Ave, Std, Max, Min）** 検出ピーク間の時間
(3)	**Ratio（Ave, Std）** 検出ピークのレシオ値　※Ratio =（AMP + RMP）/ RMP
(4)	**AMP（Ave, Std）** 検出ピークの値からRMPを引いた値
(5)	**RMP（Ave, Std）** 検出ボトムの値
(6)	**Slope（Ave, Std）** 検出ピークに対する反応の傾き 解析位置を選択可能 0 % ～ 100 %, 10 % ～ 90 %, 20 % ～ 80 %, 30 % ～ 70 %
(7)	**Area under curve（Ave, Std）** 検出ピークを挟むボトム間のデータの積算値
(8) ～ (16)	**PWD（PWD10 ～ 90）[ms]（Ave, Std）** 検出ピークに対する、指定した反応量のCa^{2+}変動持続時間 10 %, 20 %, 30 %, …, 80 %, 90 %、の解析を選択可能



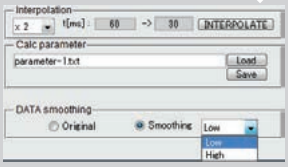


操作手順

1 FDSS測定データの読み込み

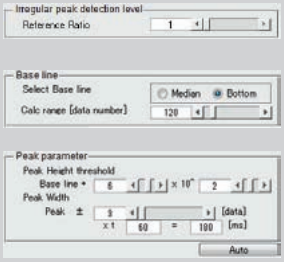
FDSSソフトウエア上のボタンで、波形解析用、ソフトウエア起動、データ読み込み

2 解析に共するデータの処理



- ●Interpolation
  データ間を補間して、データ数を増加
- ●Smoothing
  測定データのノイズを除去するか選択可能

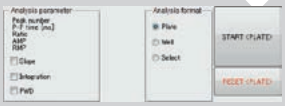
3 解析条件設定



- ●Irregular peak detection level
  イレギュラーピークの判断基準
- ●Base line
  波形のベースラインを検出するためのパラメータ設定
- ●Peak Parameter
  ピークとして検出することができるピークの最低反応量、またピーク間の最低値
- ●AUTO
  解析パラメータを自動計算

4 解析実行

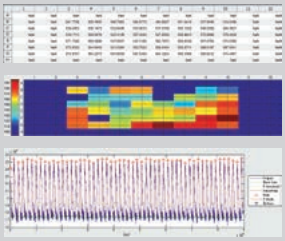
解析する項目を選択して、
全ウエル一括解析 / 各ウエル解析



5 解析結果の表示

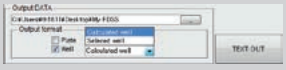
全ウエル一括表示 / 各ウエル表示

- ●プレートマップに各解析結果の値を表示
- ●解析結果の値の大小に対応したヒートマップを表示
- ●ウエルごとのピーク検出グラフを表示



6 解析結果の出力

プレートフォーマット / 各ウエルごとに出力、テキストファイルに対応（.txt）



実験の手順

iPS細胞由来心筋細胞のCa^{2+}アッセイ

（用いる細胞: iCell® Cardiomyocytes、Cellular Dynamics International社製）

1 Thawing and Plating cells in 96 well microplate

Step1 使用するマイクロプレートを指定方法でCoating

Step2 細胞供給会社のUser's Guide※に準じた細胞播種と培養を実施

※User's Guideについて

以下URLより、iCell Cardiomyocytes のUser's Guideを取得可能です。
https://cellulardynamics.com/assets/CDI_iCellCardiomyocytes_UG.pdf
なお、User's Guideは随時更新されております。最新版は別途ご確認ください。

2 Loading of Ca^{2+} indicator into cells

Loading Bufferの構成品リスト

HEPES-Hank's Balanced Salt Solution (pH7.4)	Thermo Fisher Scientific Thermo Fisher Scientific	#14025-092 #15630-056
2 μM Fluo 8 AM	AAT Bioquest	#21083
0.05 % Pluronic F-127	Thermo Fisher Scientific	#P-6866
1.25 mM Probenecid	Sigma	#P8761

Step1 Loading Bufferの調製（37 ℃）

Step2 Loading
- Culture mediumを除く
- +37 ℃ Loading Bufferを80 μL/well分注する
- 1時間、インキュベーター（+37 ℃　5 %CO_2）内で色素のLoading

Step3 Wash out
- Loading Bufferを除く
- +37 ℃ HEPES-HBSSを100 μL/well分注する

3 FDSS Data Acquisition / Data Analysis

Step1 装置セットアップ
- 測定の30分前に電源ON、カメラ冷却とステージ保温を実施する
- FDSSソフトウエアを起動する

Step2 プロトコル設定（プロトコル画面からの設定）
- インターバルは10 ms～30 msの範囲、及びサンプリング数を設定する
- 分注条件を設定する（分注量・分注速度・分注高さ・吸引）

Step3 データ取得と解析
- 設定プロトコルにてデータ取得を実施し、ファイル保存する
- 任意のパラメータにより波形解析を実施する

測定・解析例

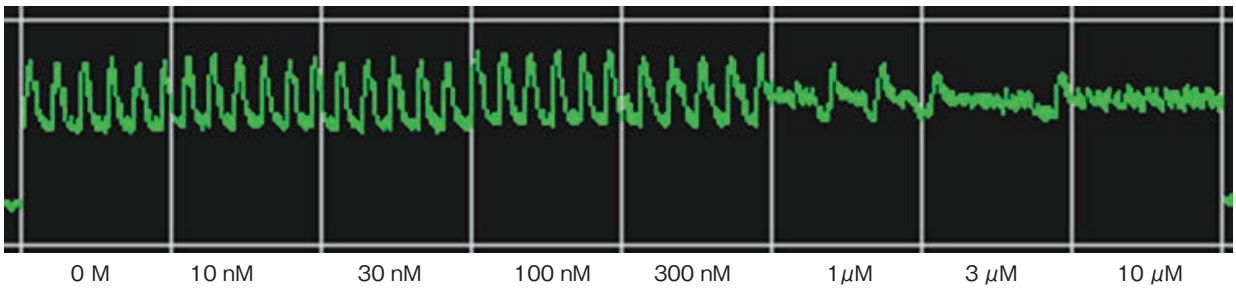
iPS細胞由来心筋細胞を用いた化合物の毒性評価例

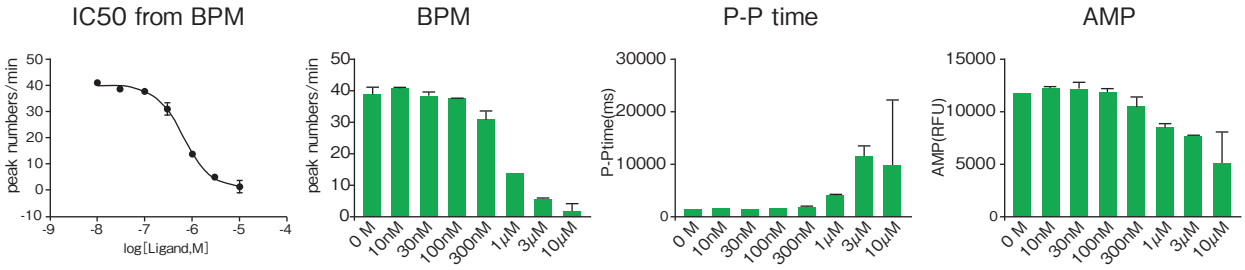
FDSS/μCELLを用いて心毒性を示す3種の公知の化合物（医薬品）の iPSC-CMへの影響を評価する目的で、ヒトiPS細胞由来心筋細胞（iCell® Cardiomyocytes）のCa^{2+}アッセイを実施しました。
（実験の手順は前ページを参照）

評価化合物リスト

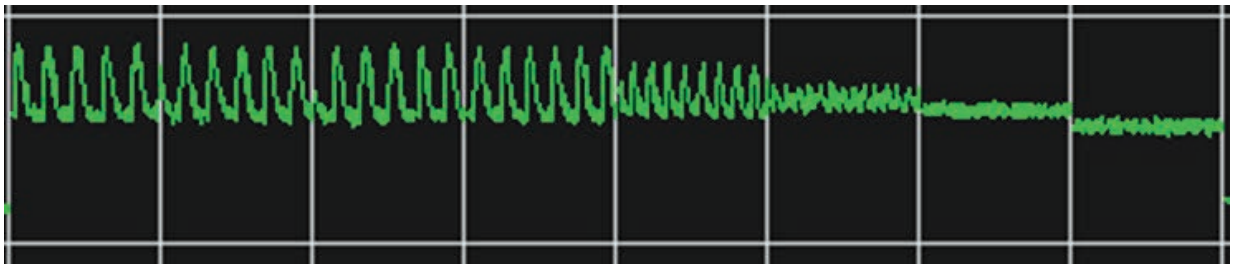
薬剤	説　明	不整脈	収縮性	分注後の薬剤濃度
E-4031	hERGカリウムチャネルブロッカー 心筋細胞の再分極時にIKrを選択的に抑制する化合物	●		10 nM ～ 10 μM
Verapamil	Ca^{2+}チャネルの開口抑制することで 頻脈性不整脈を抑制する化合物	●	●	10 nM ～ 10 μM
Isoproterenol	β受容体に作用して心筋細胞を刺激する化合物		●	10 nM ～ 10 μM

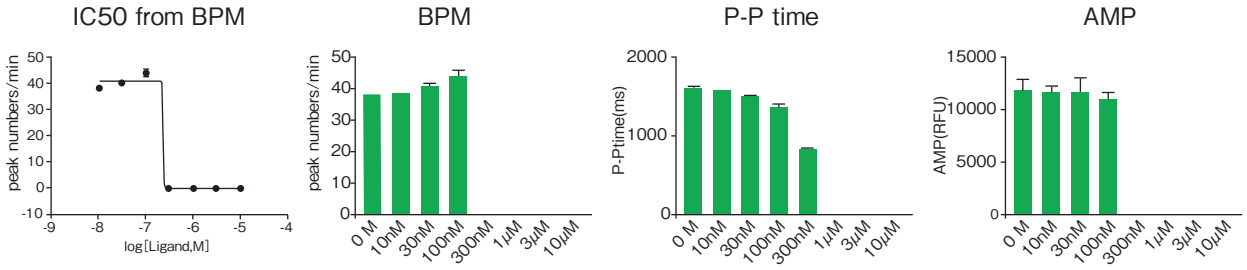
化合物①　E-4031



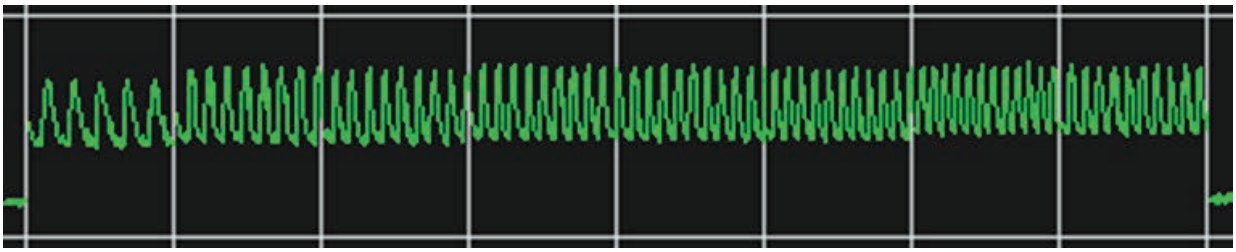


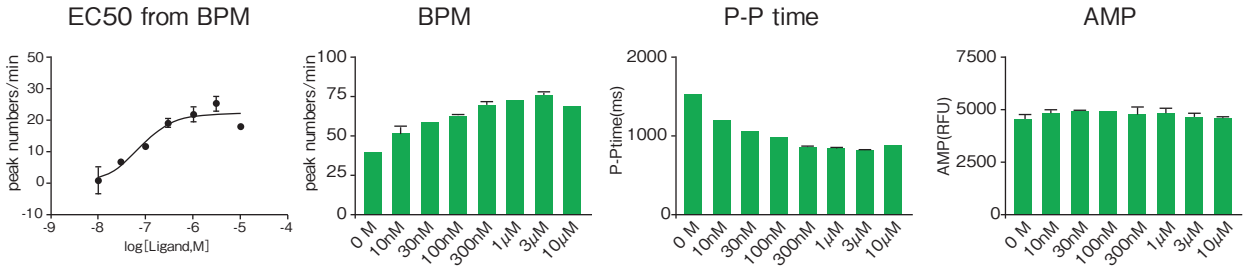
化合物② Verapamil





化合物③ Isoproterenol





FDSS/μCELLで取得したCa^{2+}濃度変化の波形を解析した結果から、各評価化合物について、薬効の用量依存性や心筋拍動への影響を確認することができました。

本例のように、FDSS/μCELLは、創薬プロセスの従来より早期の段階における心毒性化合物の評価・同定用ツールとして使用することができます。FDSS/μCELLを用いたiPSC-CMのCa^{2+}アッセイにより、潜在的な心毒性化合物の影響を容易に検出・評価することができます。

本アプリケーションに必要なシステム構成

（構成要素･型名･説明）

分注装置本体 アッセイプレートステージ 試薬プレートステージ 蛍光光学系	A11529-01A A11529-03 A11529-04 M11031-01	96ウエル、384ウエルのクリアボトムプレート（黒）に対応、分注高さ可変 アッセイプレート:1枚、試薬プレート:2枚 を設置可能（設置は手置き）
分注ヘッド (選択可) 分注ヘッド（96chチップ式） 分注ヘッド（384chチップ式）	— A10118-24 A10118-26	96ウエル、384ウエルマイクロプレートへの試薬同時分注が可能、チップ式 96ウエル同時分注（10 μL～200 μL）、384ウエル同時分注（1 μL～30 μL）
チップ着脱器	A11529-02	96 ch、384 chの専用分注チップの着脱に使用
励起光源ユニット（B）	L11601-01	B励起用LED光源ユニット　ex: 470 nm、em: 540 nm
ImagEM X2 EM-CCDカメラセット	C9743-23B	超高感度EM-CCDカメラ
ヒータユニット	A11529-14	温風方式、アッセイプレート近傍温度を +35 ℃～+37 ℃ に制御
データ解析装置 FDSS/μCELL用	C7903-05	FDSS制御用PC、FDSSソフトウエア含む
FDSSソフトウエアオプション 高速データ取り込み機能	U8524-11	高速データ取り込み用　FDSSソフトウエアオプション
FDSSソフトウエアオプション 波形解析機能（心筋用）	U8524-12	心筋細胞内Ca^{2+}測定波形解析用　FDSSソフトウエアオプション
EFSペーシングシステム	M13040-01	96マルチEFSヘッドと専用ジェネレータ

消耗品

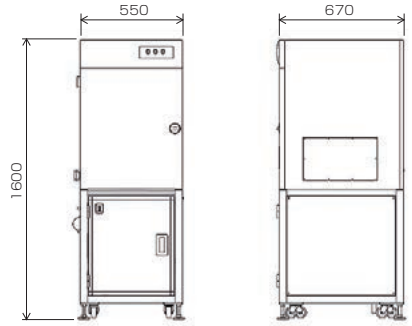
96黒チップ（10ラック）FDSS7000/μCELL用	A8687-32A	96ウエルマイクロプレート用使い捨てプラスティック製チップ、10ラック入り
384黒チップ（10ラック）FDSS7000/μCELL用	A8687-62A	384ウエルマイクロプレート用使い捨てプラスティック製チップ、10ラック入り

外形寸法

外形寸法/質量（本体）	550 mm(W) × 1600 mm(H) × 670 mm(D)/約200 kg
外形寸法/質量（データ解析装置）	300 mm(W) × 500 mm(H) × 500 mm(D)/約20 kg

【外形寸法図 （単位： mm）】

●本体



本アプリケーションに関するお問い合わせやデモンストレーションのご希望は、システム営業推進部までお気軽にご連絡ください。

★FDSS は浜松ホトニクス（株）の登録商標です。

※本カタログの掲載内容は、2016年12月現在のものです。本内容は改良のため予告なく変更する場合があります。

浜松ホトニクス株式会社

www.hamamatsu.com

□ システム営業推進部　〒431-3196　浜松市東区常光町812
TEL (053)431-0150　FAX (053)433-8031
E-Mail　sales@sys.hpk.co.jp

□ 仙台営業所　TEL (022)267-0121　FAX (022)267-0135
□ 筑波営業所　TEL (029)848-5080　FAX (029)855-1135
□ 東京営業所　TEL (03)3436-0491　FAX (03)3433-6997
□ 中部営業所　TEL (053)459-1112　FAX (053)459-1114
□ 大阪営業所　TEL (06)6271-0441　FAX (06)6271-0450
□ 西日本営業所　TEL (092)482-0390　FAX (092)482-0550

SBIS0097J03
DEC/2016 HPK