

機 器 仕 様 書

1. 品 名：遺伝子導入装置 (Scalable Transfection System - STX)

2. メーカー名：米国 MaxCyte 社 (国内取扱；株式会社 BTB Japan)

3. 概 要

本装置は、電気穿孔法に基づき細胞に、DNA、mRNA、siRNA 及び蛋白質を短時間で効率良く導入を行う事を目的とした装置です。

4. 機器構成

- ① 本体 遺伝子導入装置
MaxCyte STX Scalable Transfection System and software
(including standard protocols)
- ② パソコン HP 社 Compaq dx2000MT 相当
- ③ ソフトウェア MaxCyte STX ソフトウェア
- ④ 無停電電源装置 APC 社 BR1000G-JP 相当

5. 仕様及び性能

① 遺伝子導入装置

- 1-1 導入効率 90%以上
(CHO 細胞に GFP をコードした DNA プラスミドを導入した場合)
- 1-2 生存率 90%以上
(CHO 細胞に GFP をコードした DNA プラスミドを導入した場合)
- 1-3 処理量 5×10^5 から 1×10^{10} cells
- 1-4 処理速度 最大 1×10^{10} Cells を 30 分以内
- 1-5 導入手法 フロー式電気穿孔法
- 1-6 本体寸法 W460×D540×H700mm
- 1-7 電気容量 AC100V 2A

② パソコン

- 2-1 OS Windows XP
- 2-2 メモリ 256MB 以上

2-3 HDD 40GB 以上

2-4 ディスプレイ 15 インチ TFT ディスプレイ

③ ソフトウェア

3-1 導入条件プロトコル 30 種類以上

④ 無停電電源装置

4-1 入力電力 100V

4-2 出力容量 1000VA

4-3 出力コンセント数 8 個

4-4 充電時間 16 時間

4-5 バックアップ時間 約 5 分程度

MaxCyte STX—技術基礎—

(1) 概要

MaxCyte 社のトランスフェクション技術は、細胞懸濁液に電界を生じさせることで一時的な膜透過性を亢進させ DNA 等の外部物質を細胞内に導入するという一般的な電気穿孔原理に基づいております。さらに、この基本原理を活用し、少量から大量処理が可能な簡潔かつ柔軟性のある特許化された電気穿孔システムを開発しました。

MaxCyte 技術は多くの細胞株で 90%を超える導入効率を示しております。所要処理時間は、静止型の電気穿孔法で $5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^8$ 個の細胞に対して数秒レベルであり、またフロー型電気穿孔法では $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個の細胞に対して 30 分以下です。

【特徴のまとめ】

1. 少量処理から大量処理までを可能とするシステムの簡潔性と柔軟性；

1) 処理細胞数に合わせた 4 種の処理用アセンブリ

アセンブリタイプ	試料容量	適用細胞数	処理法
OC-100	100 uL	$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$	静止型
OC-400	400uL	$2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^7$	
CL1.1	3 mL	$1.5 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$	
CL2	100 mL	$5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$	フロー型

2) 細胞タイプに合わせたプレインストール最適化プログラム

3) 全ての細胞株に共通のトランスフェクト試薬 (MaxCyte Electroporation Buffer)

2. 安定したトランスフェクション性能；高い導入効率と細胞生存率

3. 広い応用範囲；基礎研究から臨床応用

1) ex vivo 細胞療法における細胞調整

2) 抗体をはじめとする各種蛋白質の研究用あるいは評価試験用試作

3) 創薬研究において利用される均質な遺伝子導入標的細胞の大量調製



大量処理用アセンブリー (CL2) を装着した STX システム

MaxCyte STX—技術基礎—

(2) 処理容量と性能; MaxCyte STX は、少量処理から大量処理まで一つの装置で同じプロトコルで行える電気穿孔システム

少量処理(静止型電気穿孔法、Static electroporation)の手順は、通常の方法で採取した培養細胞を純化学的試薬である MaxCyte Electroporation Buffer に高密度(1×10^7 - 1×10^8 個/mL)に浮遊、トランスフェクトする物質溶液を添加・混合、電気穿孔チャンバに注入、STX 装置本体に装着の流れとなります。

大量処理(フロー型電気穿孔法、Flow electroporation)では、対象細胞とトランスフェクトする物質を混合し大量処理用アセンブリの無菌バッグに注入し、装置本体に装着します。処理が開始されると 3mL ずつの画分が順次電気穿孔チャンバに送られ数秒の処理が行われます(図1)。

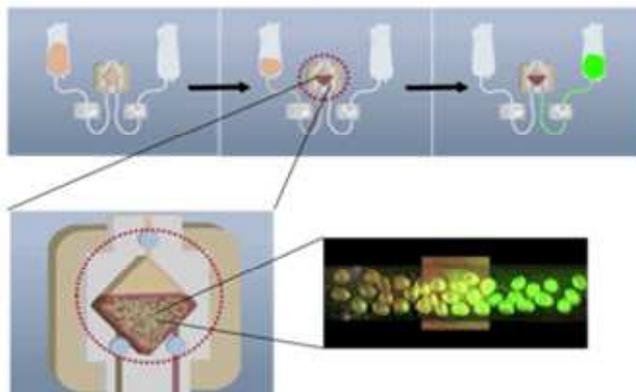


図1 大量処理(Flow electroporation)概念図

フロー型電気穿孔では、 1×10^{10} 個の細胞処理が 30 分以内で完了します。

トランスフェクトされた細胞は、20 分間の放置後直ちに、あるいは超低温保存後使用が可能です。大量処理における導入効率(GFP 蛋白発現)と細胞生存率の画分間再現性を評価したところ、 6×10^9 の細胞処理で、画分間で差がないことおよび少量処理(4×10^7)との比較でも性能は変わらないことを確認出来ます(図2)。

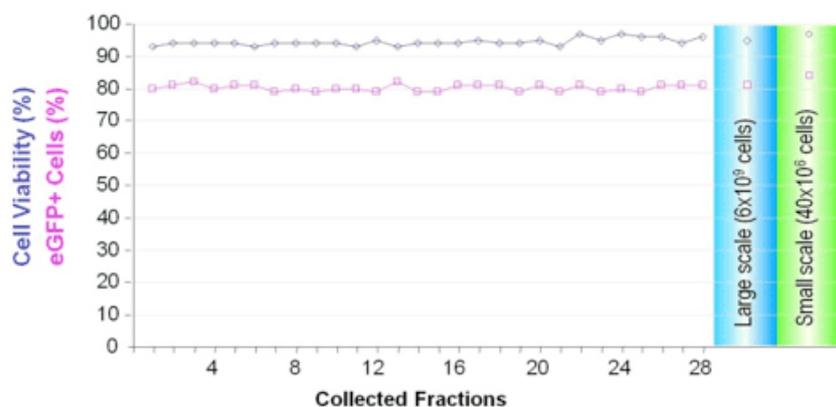


図2. フロー型電気穿孔法による正確なトランスフェクション

6×10^9 個の K562 細胞に pGFP DNA を K562 用プロトコル用いフロー型電気穿孔法でトランスフェクトした。28 の分画物についてトランスフェクト 24 時間後に細胞生存率(%propidium iodide 非染色細胞)および導入効率(% GFP 陽性細胞)を測定した。また、 4×10^7 個の少量処理を別途静止型電気穿孔法で行い、フロー型との性能比較を行った。

MaxCyte STX—技術基礎—

(3) プレインストールされたプロトコール; Maxcyte STX は細胞タイプ別プロトコールを用いる電気穿孔システム

STX システムの導入効率と細胞生存率は多くの細胞で 90%を超える。遺伝子発現の変動幅は小さく抑えられ、高信頼性、高効率の測定を可能としている。

現在、50 種類以上の細胞(下表)に対するプロトコールが用意されており、さらに拡充を図っております。このリストには、これまで困難とされていた**プラマリー細胞、幹細胞**へのトランスフェクションプロトコール並びに **CHO** と **HEK** に対しては**標準プロトコールに加えタンパク質高産生用**プロトコールが含まれております。

プロトコール最適化等の個別的技術課題に関して相談窓口を開設しております。

細胞タイプ別プロトコール(ABC 順、2013 年 1 月現在計 51 種類)	
A549、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP/CAP-T、CHO、 CHO2 (蛋白質高産生) 、COS-1、Cos-7、CV-1、DLD-1、H1299、HEK 293、 HEK2 (蛋白質高産生) 、Hela、Hep G2、HOS、Huh-7、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、 Mesenchymal Stem Cells 、Min-6、Neuro2a、NIH 3T3、NIH3T3L1、NS0、Panc-1、PC12、PC-3、 Primary Fibroblasts 、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、THP-1、U2OS、U937、Vero	

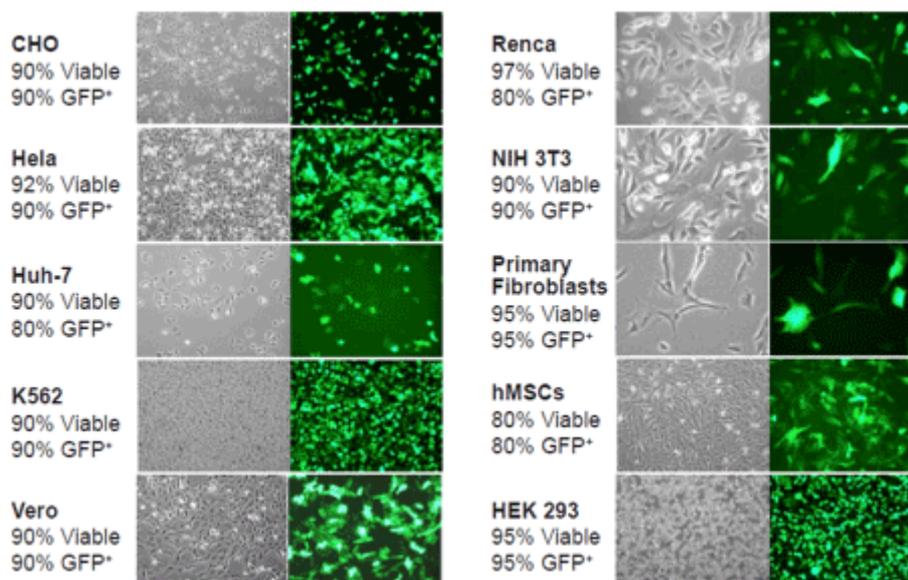


図3 STX によるトランスフェクションの実施例

10 種類の細胞株に関して、個別のプレインストールされたプロトコールを用い、200µg/ml pGFP DNA のトランスフェクションを行った。トランスフェクト 24 時間後、細胞生存率 (propidium iodide 非染色細胞%) と導入効率 (GFP 陽性細胞%) を測定した。

MaxCyte STX—技術基礎—

(4) 臨床応用； MaxCyte の電気穿孔技術は FDA ガイドラインに準拠。

細胞改変技術が臨床的に意義を持つためには、cGMP 準拠した製造に組み込まれ得る下記の条件を満たすトランスフェクションシステムでなければならない； i) 大量の細胞を ii) 無菌的に iii) 高い導入効率と最小限の細胞損傷でトランスフェクト出来かつ iv) 性能を安定的に継続維持しうるシステム。

MaxCyte の電気穿孔技術は、他に類を見ない性能の安定性、拡張性、そして高いトランスフェクト効率を兼ね備える一方、ウイルスベクター技術や化学トランスフェクション法が持つ本質的に避けられない安全性に関する欠陥とは無縁の技術である。

システムの持つ簡潔性と安全性により、臨床応用への開発時間の短縮を加速させると期待される。 実際、MaxCyte の技術提携先は IND 申請を予測時期より6ヶ月早めることに成功している。

また、MaxCyte の臨床グレードのトランスフェクション技術は、既に、FDA Master File に登録され、RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) の審査を通過している。