

大規模データ取得のための実験自動化技術の現状と展望

堀之内貴明

はじめに

近年の分析技術の飛躍的な向上により、オミクス解析などの網羅性の高い分析技術が登場し、一度の計測により多量のデータが得られる時代が到来した。これにより、個別の研究において、一斉分析により絨毯爆撃的な新規知見の探索が行われるのはもちろんのこと、個別研究により得られたデータセットがデータベースに多数蓄積され、複数のデータセットを利用した研究が盛んに行われていることは周知の通りであろう。また、オミクス解析のランニングコストの低下や分析当たりの算出データ量の増大が現在も継続しており、さらなるデータの蓄積と近年の計算機性能の向上、AI技術の進歩などにより、バイオインフォマティクスは新たな局面を迎えつつある。

こうした状況において、データベース上におけるデータセット間の接続性の問題が表出している。つまり、データセット間には実験条件や実験プロトコル、使用機器や実験者の手技の違いなどに由来する系統的なバイアスが存在し、それらの統合の際に問題となる。そこでデータの質を担保する枠組みが必要になり、それに対し実験自動化技術が一つの有効な解決策になると筆者は考えている。つまり、実験自動化により実験者の手技の差を除外することができ、また論文に記載することが困難な実験のコツのような暗黙知への依存や曖昧性を排除し、実験内容は装置の実行メソッドという形で完全に明文化することが可能となる。このような情報の明文化と規格化は、データベース上へのメタデータの付記も容易にし、データセット間の横断的な利用の加速をもたらすであろう。

また、オミクス解析のランニングコストの低価格化のおかげで、より多くのサンプルを解析できるようになると、サンプル調製の過程が作業上のボトルネックとなる状況が発生する。ここでも実験自動化は有効であり、実験者の負荷やヒューマンエラーなどの課題を解決可能である。

このように、実験自動化は計測技術やバイオインフォマティクスを含む生物工学分野の今後の動向に密接に関与する。そこで本稿ではまず、実験自動化のさまざまな例をあげ、現在どのような実験が自動化されているかを紹

介する。次に、筆者らの実験を題材とし、その自動化にあたり生じた課題やその克服について紹介する。

自動液体分注装置を用いた 色々な実験の自動化

現在ライフサイエンス分野で見られる実験自動化の多くは、自動液体分注装置を用いたものである。たとえば創薬分野では、ハイスループットスクリーニングにおける自動分注機の利用が20年ほど前から盛んに行われており¹⁾、こうした自動分注装置についてはすでに一定の市場が確立している。また近年のNGSなどの普及により、サンプル調製を多数行う必要性、サンプル間のばらつきを低減する必要性が高まり、NGSのシーケンシングサンプル調製の自動化などにこうした自動分注機を利用する例が増えている。また最近では3Dプリンターやオープンソース電子モジュールの充実、産業用ロボットの転用などにより、安価とまではいえないものの、装置の低価格化が進んでおり、以前よりも研究室単位で実験自動化に取り組むことが容易になりつつある。そこで以下に、液体分注機をはじめとした自動化装置による実験自動化のさまざまな例をあげ、どのような実験の自動化がなされているのかを紹介する。紙面の都合上、本稿では概要を紹介するに留める。詳しくは各文献を参照していただきたい。

以下では例示の便宜上、自動化する実験内容として、1) オミクス解析などの計測に供するためのサンプル調製やサンプル前処理の自動化、2) サンプルや検体など実験材料そのものの取得の自動化と大別した。分類1は計測に供するために所定の前処理法やサンプル調製法に従う必要がある場合が多く、自動化装置が扱うサンプルの性質はある程度均質であると考えられる。たとえばNGSの場合、扱うサンプルは専ら精製済みの高純度の核酸である。こうした場合には、ひとたび系を構築できればその後は安定に運用でき、基本的にはサンプルごとに実験プロトコルを調整する必要はない。これに対して分類2では、あるサンプルに仕様を最適化しようとする、それに伴って汎用性を犠牲とせざるをえないことが多く、結果的に特定の用途のための専用機として運用することが多いように思われる。たとえば一細胞を分取し

て解析するような装置の場合、一桁以上サイズが異なるような分布を持つ細胞集団を同じ仕様で扱うことは容易ではなさそうだとはいえ想像が付くであろう。

実験自動化の具体例を、筆者の知る例を中心に紹介する。分類1の例として、ヒトのゲノムリシーケンス用サンプル²⁾、シロイヌナズナの種子1粒の細胞内代謝物サンプル³⁾などさまざまなサンプルを対象とし、溶液の一斉分注や希釈操作などを自動化した事例がある。オートサンプラーや自動化遠心機、ヒートブロックなどのアクセサリとの組合せによって、サンプリングや酵素反応、精製など、より複雑な操作からなる実験の自動化を試みた例もあり、たとえば植物のRNA-Seqライブラリ調製⁴⁾、ヒト口腔細菌叢からのDNA抽出⁵⁾、メタボロミクスのサンプル前処理⁶⁾、高精度シングルセルRNA-Seqへの適用⁷⁾などの試みがある。また分類2では組織切片からの微小片の自動採取⁸⁾、一細胞スクリーニング⁹⁾、一分子イメージング¹⁰⁾、RNAやタンパク質の自動合成¹¹⁾などの例がある。いずれの例においても、省力化やスループット向上、実験者ごとの手技の違いによるバイアスの除去、サンプルの取り違いなどのヒューマンエラーの防止など、多くの恩恵が自動化により得られている。

全自動培養システムによる 実験室進化の自動化とその利用

筆者らは実験室進化というアプローチを用いて生物の適応能力の理解やその応用に関する研究を行ってきた。この実験室進化の自動化にも取り組んでおり、以下でその内容について紹介する。

まずは実験室進化の特徴を述べる。生物システムは、厳しい環境条件に直面しても適応進化によってそれを克服する能力を有する。これを利用し、実験室内において特定の環境下で継代培養などにより長期間にわたって世代を経させることにより、その環境に対して適応進化させるのが実験室進化である。この手法は適応進化の前後およびその過程のサンプルを取得可能であるという利点を有する。そのため適応進化過程において細胞にどのような変化が生じたかを解析することにより、有用な形質の育種や、有用株をデザインするための知見を得ることができる方法論として注目されている^{12,13)}。たとえば、あるストレス環境下での進化実験を行い、得たストレス耐性株に対してゲノムリシーケンス解析を行うことで、ストレス耐性株にどのような変異が生じたかを同定することが可能である。またトランスクリプトーム解析などにより、ストレスへの適応進化の際に細胞の生理状態がどのように変化したかを包括的に記述可能である。

一方で、実験室進化の実施はしばしば実験者に大きな負荷となる。たとえば植え継ぎ培養による長期培養実験の場合、その環境に対する適応進化が観察されるまで植え継ぎ培養を継続する必要があるため、長期間にわたり同一の実験を繰り返す必要が生じる。こうした負担のために同時に行うことのできる実験数に制限が生じる。そこで筆者らは自動分注機をベースとした全自動の実験室進化システムを構築した¹⁴⁾。

次に、どのようにして植え継ぎ実験が自動で行われるかを述べる。全自動実験室進化システムの外観を図1に示す。自動分注機（ベックマン・コールター社製 Biomek NX[®]）に自動化インキュベータ（Liconic社製）、プレートリーダー（モレキュラーデバイス社製）などを接続しており、コンピュータ制御により全自動で各種の実験操作が行われる。具体的には、定められた時刻になるとインキュベータから培養用プレートが搬出され、直ちにプレートリーダーへと運び込まれ、吸光度が測定される。この吸光度のデータに基づき、培養液の一部は新鮮な培地が入った新たなプレートへと植え継がれる。この際には吸光度の測定結果に基づき、植え継ぐべき培養液の体積の自動計算が行われている。植え継ぎが完了したプレートは再度インキュベータへと搬入される。インキュベータには44枚までプレートを格納することができ、こうした操作を逐次行わせることにより、384穴プレートをを用いた場合で最大約16,000系列の培養を同時に行うことが可能である。実験において用いられるチップ、培養用プレート、培地入りリザーバーなどの消耗品をプレート格納用ホテルにあらかじめ入れておき、その消費量を変数としてコンピュータ上で管理することにより、自動で物品を交換させることができる。これら一連の操作には人間の一切の介入は必要なく、実験者はプ

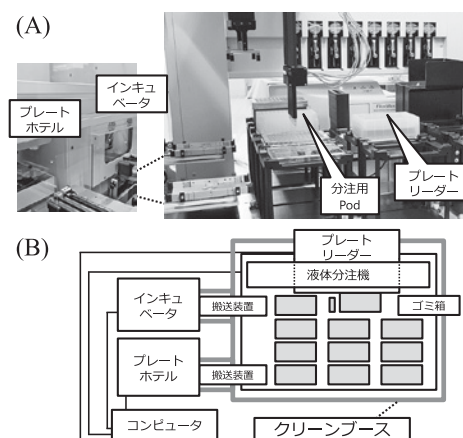


図1. 全自動培養システムの(A) 外観および(B) 装置構成

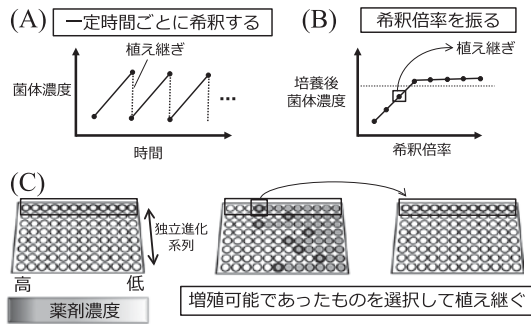


図2. 全自動培養システムを用いたさまざまな植え継ぎ実験系の例。(A) 一定時間間隔で植え継ぎ培養を行う実験系。(B) 希釈倍率を振って一定時間後に適当な菌体濃度のものを選び植え継ぐ系。(C) 薬剤添加濃度を振って増殖が可能であったものを植え継ぐ実験系。

プレート格納用ホテルの消耗品を定められたタイミング(実験によるが1日1回程度)で補充するだけでよい。システムが作動している動画をWeb上で公開している¹⁵⁾。

以上のような枠組みによる植え継ぎ培養をベースに、筆者らはこれまでいくつかの異なる実験デザインの進化実験を実装している。図2にその概要を示す。図2Aには、一定時間ごとに植え継ぎを行う実験の例を示している。植え継ぎ直後と一定時間後の菌体濃度から比増殖速度を算出し、前回植え継ぎ時の比増殖速度に基づいて希釈倍率を決定することにより、指数増殖期を保ちつつ比増殖速度をモニターしながら植え継ぎ培養を繰り返すことが可能である。この系をさらに発展させ、毎回の植え継ぎ時に希釈倍率を振ったような複数の培養系列を準備し、一定時間後に適当な菌体濃度の系列を選択するという系を構築している(図2B)。これにより、比増殖速度の変動が大きい実験系においても、より安定に植え継ぎ培養を繰り返すことが可能である。また図2Cに示すように、薬剤添加濃度を振ったような培地を準備してそれらすべてに植菌を行い、増殖が可能であった最大薬剤濃度の系列を植え継ぐという実験系も構築している。この実験系は抗生物質のような、ある薬剤濃度を超えると急激に細胞増殖を阻害するような用量-反応曲線の化合物を題材とするような場合に特に有用である。これらの実験系を用いて筆者らはこれまでに、さまざまな化合物を添加した環境における実験室進化によるストレス耐性菌の取得¹⁶⁾や、遺伝子破壊が薬剤の耐性・感受性スペクトルに及ぼす影響の解析¹⁷⁾を行った。得られた耐性菌のゲノムリシーケンス解析やトランスクリプトーム解析も行ったが、本稿では紙面の都合上紹介できないので、文献^{13,16)}を参照していただきたい。

こうした実験の自動化に際して、装置の動作はすべて

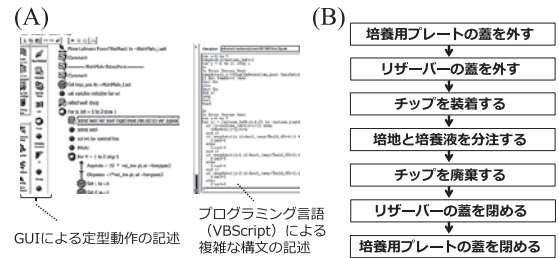


図3. (A) ソフトウェア上で作成した自動分注機のメソッドの例。(B) メソッド中のある動作のフロー。

機械言語による記述が必要となる。筆者らは分注機専用のソフトウェア(ベックマン・コールター社製Biomek Software)を使用し動作内容を記述している。図3Aにソフトウェア上で作成したメソッドの例を示す。プレート搬送や分注などの定型動作についてはグラフィカルユーザーインターフェース(GUI)が用意されているほか、変数を使用した複雑な条件分岐や繰り返し文などについては、直接プログラミング言語で記述している(Biomek Softwareの場合はVBScriptを使用)。このようなメソッドを作成する場合にはプログラミングの技術が必要となるのはもちろんのこと、実験プロトコルの最適化も同時に図る必要がある。以下にごく簡単な例で紹介する。たとえば、培地が入ったりリザーバーと培養用プレートの蓋を開け、液体を分注し、終わったら蓋を閉じるという操作があるとする。分注システムはこれらの動作を一つずつ逐次行うので、一連の動作をフローで表すと図3Bのように表せる。操作終了時にすべての蓋が閉じており、チップが廃棄されていれば、メソッドの実行上それらの順序は任意となる。しかしながら、実験上の要因、たとえば培養液の分取に使用したチップからの落下菌のリザーバーなどへの混入を避けたいとか、培養液の蒸発を最小にしたいなどのさまざまな要因を考慮すれば、フロー中の順序にも良し悪しが生じてくる。要因が複数存在し、それらを同時に満たすことができない場合には、要因間の優先順位を判断する必要がある。実験者とメソッド作成者とが協力して実験系の構築を行うような場合には、特に十分な連携や意思疎通が必要となる。

次に、このような実験自動化系を構築するにあたり生じた問題やその克服について、筆者らの事例を紹介する。本稿で紹介した実験室進化システムは、既製品(自動分注機、プレートリーダー、インキュベータなど)を組み合わせて構築したものである。個々の製品は一定の範囲で動作保証されているものの、数十枚のプレートの数か月にも及ぶ長期の植え継ぎ培養となると、想定していない部分の摩耗や損耗が起き、都度対応を余儀なくされた。

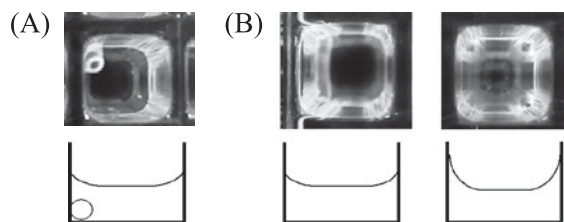


図4. (A) ウェル中に発生した気泡の例. (B) マイクロプレートの違いによる散乱光の差.

単純に損耗した部品を交換するにとどまらず、問題の再発を避けるためにメソッドの改変を行う場合もあった。たとえば関係するパラメータとして、プレート搬送時の速度や、プレート把握時の把握力、ピペッティングによる溶液攪拌の回数や速度の組合せなどを検討した。さらにその検討には、メソッドの特性（いつどのような動作が特に多く行われるのか）に対する理解も必要であった。また培養に使用するマイクロプレートには、微量分注に特有の問題が生じることがあった。たとえば自動分注機においては、ピペッティング時の液残りを防止するために、あらかじめ空気を多く吸入しておき、空気ごと吐出するという操作が一般的であるが、384穴マイクロプレートの使用時には、吐出した空気が図4Aのようにウェルの側底部に気泡として残ることがあった。こうした気泡の大きさや位置によってはプレートリーダーによる測定値に影響が出ることがあり、たとえば、液残りが生じるのを妥協し空気の吐出をしないようにするなどの対応が必要となった。また、マイクロプレートの素材や表面加工の有無により溶液の表面張力が異なることに起因し、図4Bのように散乱光が生じて測定値に影響を及ぼすことがあった。プレートリーダーは吸光度という数値化された出力を返すだけであり、問題のトラブルシュートのためには、どのような操作がどういった現象を引き起こしたのかという丁寧な観察が必要である。

このようなトラブルシュートを尽くしてもなお、すべての問題を完璧に克服することは難しい場合がある。たとえば低確率でのみ生じる事象が複数重なった場合に初めてエラーとして顕在するような場合がある。このような低頻度の問題は十分な予備試験を以てしても発見できない場合があるし、対処が有効であるかどうか試すことも難しい。そこで、とくに本番の実験（たとえば論文用のデータ取りなど）に際しては、ある程度の問題発生を織り込んで実験系を組むことが必要である。たとえば筆者らの実施例においては、植え継ぎの失敗に備えて繰り返し実験数を多めに用意したり、系自体の停止に備えて定期的に菌体ストックを作製し、バックアップを取ると

いった対処が有効であった。他にも、問題の発見やトラブルシュートのための情報を取得するために、実験系にきちんとポジコンやネガコンを組み込むことも有用であった。自動化装置は定められた内容を繰り返すことには長けており、一見すると労なく大量のデータが手に入ると思われがちである。しかし実際には、予期せぬトラブルへの対処などさまざまな問題解決を通じてノウハウを蓄積するという地道な作業が必要となり、楽のためには労多し、と表現できそうである。

おわりに

本稿では液体分注装置を中心とした実験自動化の現状について紹介した。しかしながら、装置は只々定められた動きを繰り返すのみであり、想定外のトラブルに対する対処や条件の最適化などは、結局のところ人間が行う必要がある。こうした課題に対し、近年のAI技術の発展が新たな切り口を与える可能性がある。産総研の夏目らは液体分注装置とはまったく異なる実験自動化の試みとして、双腕型のアームを持つ実験用の汎用ヒト型ロボット^{18,19)}の開発を進めており、人間が行う実験動作のロボットへの移植、さらには作業時の各種パラメータの自動探索を試みている。こうした汎用ヒト型ロボットは現在のところ非常に高価であり、膨大なサンプルの処理などには不向きであるものの、今後の生物学研究のあり方を根本的に変革するかもしれない。

文 献

- 1) 新井好史：化学と生物, **38**, 264 (2000).
- 2) Nagasaki, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **6**, 8018 (2015).
- 3) Sawada, Y. *et al.*: *Metabolomics*, **13**, 75 (2017).
- 4) 鹿島 誠ら：第39回日本分子生物学会要旨集, 2P0901 (2016).
- 5) Yamagishi, J. *et al.*: *PLoS One*, **11**, 4 (2016).
- 6) 相馬悠希ら：第69回日本生物工学会大会講演要旨集, p. 292 (2017).
- 7) Hayashi, T. *et al.*: *Nat. Commun.*, **9**, 619 (2018).
- 8) Yoda, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 4325 (2017).
- 9) Yoshimoto, N. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1191 (2013).
- 10) Yasui, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **9**, 3061 (2018).
- 11) Boles, K. S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **35**, 672 (2017).
- 12) Dragosites, M. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **12**, 64 (2013).
- 13) 堀之内貴明ら：生物工学, **93**, 536 (2015).
- 14) Horinouchi, T. *et al.*: *J. Lab. Autom.*, **19**, 478 (2014).
- 15) YouTube: <https://youtu.be/4k6qCN7ppsk> (2019/2/14).
- 16) Horinouchi, T. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 14009 (2017).
- 17) Maeda, T. *et al.*: *J. Antibiot.*, DOI: 10.1038/s41429-019-0160-5.
- 18) 夏目 徹 編：あなたのラボにAI（人工知能）×ロボットがやってくる～研究に生産性と創造性をもたらすテクノロジー, 羊土社 (2017).
- 19) Yachie, N. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **35**, 310 (2017).