

# Accurate and Automated cell confluence assessment in microplates.

40%

47%



細胞イメージング機能を搭載した TECAN の SPARK® 20M マイクロプレートリーダーが、細胞培養における品質管理と細胞密度のシグナル均一化を容易にする。



## 緒言

マイクロプレートフォーマットのセルベースアッセイは、ライフサイエンスにおいて極めて重要な位置を占めるようになった。細胞増殖、細胞毒性試験、遺伝子発現の各研究に細胞が利用される。特に長期の実験においては、研究領域を問わず、必ず細胞密度の分析と品質検査を定期的に行い、細胞の健全性を評価する必要がある。

コンフルエント(細胞密度)は、細胞培養の重要な品質管理パラメータである。一般に、増殖面における接着細胞比率の推定に用いられ、ウェルまたは培養フラスコ内の細胞密度の指標となる。一部の細胞株は、コンフルエントのレベルに応じて、成長速度または遺伝子発現に関する挙動が異なる。したがって、細胞密度の測定と細胞数の推定を一貫して行うことは、アッセイの再現性を確保し、実験データを正しく理解する上で重要といえる。しかし、顕微鏡を用いた細胞イメージングによる可視化は、特に複数の試料を分析する場合、多くの時間と労力を要する。

この問題の解決策となるのが、細胞密度の自動測定である。この機能により、実験作業の流れが格段にスムーズになり、開始条件の変動に起因する実験間のばらつきを最小限に抑えながらスループット向上を実現することができる。長期の実験では、ライブイメージングによる測定値をもとに細胞の増殖と健全性を観察することで、信頼性の高い品質検査を顧客に提供できる。

明視野の細胞イメージングモジュールを搭載した Tecan の Spark プラットフォームなら、簡便な使い捨ての Cell Chip™を使い、細胞カウントと生存率測定ができる。さらに、このイメージングモジュールは、マイクロプレートのウェル内の細胞密度をラベルフリーかつリアルタイムで評価することができる。明視野画像をもとに 6 ウェルから 96 ウェルのマイクロプレート内で細胞に覆われた領域を探し、分析データから相対密度を計算する。なお、細胞密度測定は、細胞関連の他のシグナル(蛍光シグナルなど)を細胞数に対して正規化する際にも使用できる。

## コンフルエントソフトウェア アプリ

Spark のイメージング機能を補完する役割を果たすのが SparkControl™ソフトウェアである。直観的に使える、簡便な細胞密度分析ソフトウェアの SparkControl™なら、各種プレートフォーマットおよびユーザ定義のパターンで信頼性の高い測定が可能である(図 1)。包括的かつユーザフレンドリな機能を搭載する SparkControl™は、エンドポイント法およびカインティック法でのシングルラベルまたはマルチラベルによる密度測定が可能だ。1 ウェルにつき 1 画像を取得する場合、96 ウェルプレート全体の測定が 5 分以内に完了する。

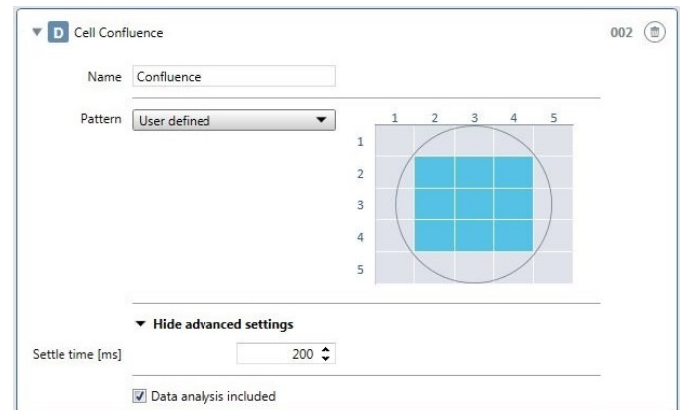
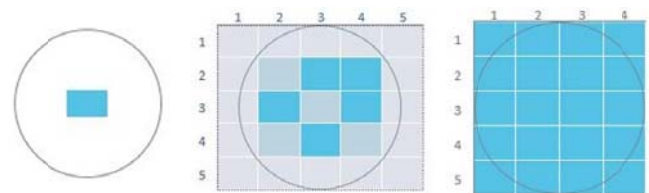


図 1: SparkControl ソフトウェアでの細胞密度のストライプ画面

便利なストライプ画面によって、ウェル内の複数の領域を選択することができる(図 2)。アッセイの要求事項に応じて、各ウェルの中心部の画像のみを取得するか、隣り合う複数の画像から生成したウェル全体の画像を取得するかを選択できる。さらにこのソフトウェアは、マイクロプレートの寸法上のばらつきを補正するウェル境界自動検出機能も搭載している。

図 2: 密度測定パターンのオプション



本アプリケーションノートでは、長期実験における Spark 20M のコンフルエント測定値と、細胞に結合した GFP 蛍光シグナルの測定値を細胞増殖の指標として同時に取得し、比較した。





## 材料および方法

Spark 20M マルチモードリーダーにて長期実験を行った。Spark 20M が搭載するガスコントロールモジュール(GCM)を使用し、温度を 37°C、二酸化炭素濃度を 5% に設定した。測定時は、Tecan が独自開発した Humidity Cassette に蒸留水を注入してプレートを入れ、最適な細胞増殖条件となるようにした。なお、測定時には Spark が搭載する特許製品のリッドリフター™ で Humidity Cassette のフタを自動開閉した。

GFP で安定してトランスフェクションされたヒト扁平上皮癌細胞 (A431, ATCC No.1555) を、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシン、HEPES および 5% 熱不活化ウシ胎児血清(FCS) (PAA Laboratories) を添加した DMEM 高グルコース (Sigma) 中で、37°C および二酸化炭素濃度 5% の加湿空气中でコンフルエントになるまで増殖培養した。

その後、トリプシン/EDTA を用いて増殖フラスコから細胞を採取し、96 ウェル組織培養プレート (Greiner, No 655162) に低い初期密度で播種して、制約なく 48 時間増殖培養した。特に蛍光測定において最大限の測定感度を得るために、フェノールレッドフリーの培地を使用した。

細胞密度と GFP 蛍光シグナルを 48 時間、所定の間隔で同時に記録した。測定条件の詳細を表 1 に示す。各測定間はマイクロプレート機器のインキュベーションの位置に移した。

表 1. 測定条件

パラメータ	設定値
測定方法	カイネティック法
測定時間	48 時間
測定間隔	15 分
測定モード 1	Confluence
パターン	ウェル全体
データ解析	有効
処理時間	200 ms
測定モード 2	下方蛍光強度測定
励起 (EX) 波長	485 (20) nm
発光 (EM) 波長	535 (20) nm
フラッシュ数	15 (5x3/ウェル、最適測定)
ゲイン	最適化 (90%)
Z 軸	ウェルから計算

## 結果

図 3 は、長期実験で得られた細胞密度および蛍光シグナルの測定値である (便宜上、データ点は 4 時間刻みで表示)。いずれの曲線もほぼ同一の反応速度を示し、おおよそ 15% コンフルエント (約 8,000 RFU に相当) から 50% コンフルエント (約 32,000 RFU に相当) まで安定的に増加している。

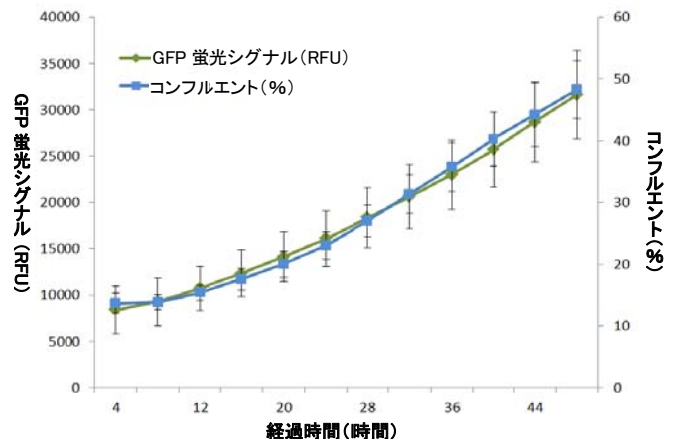


図 3: Spark 20M による細胞密度および蛍光シグナルの測定値

SparkControl™ のアルゴリズムを用いて同定されたすべての細胞を緑色で表示し、細胞密度のレベルを可視化した。ウェル画像の左上隅に表示された細胞密度測定値は、測定終了後、インタラクティブに Excel シートへエクスポートされる。

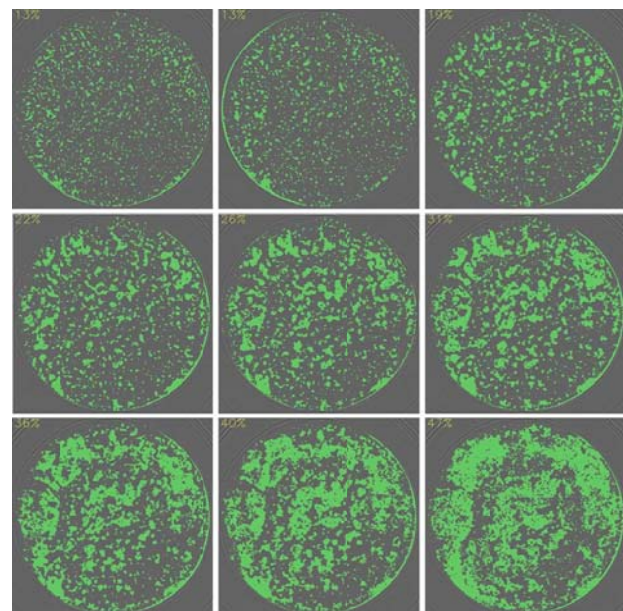


図 4: 細胞に覆われた領域を緑色でオーバーレイ表示した。細胞数が連続的に増加していることが分かる。



上記の実験の測定画像について、細胞に覆われたウェル領域を緑色でオーバーレイ表示したところ、細胞数が連続的に増加していることが明らかとなった(図 4)。

なお、測定結果は Excel シートに集約され、記録画像(明視野画像とウェル単位で検出したコンフルエント値が表示された評価画像のセット)へのアクティブなハイパーリンクもあるので、データの取扱い、エクスポート、より詳細な評価がスムーズに行える。

図 5 は、細胞密度のレベルと GFP 蛍光シグナルの関係を示したものである。いずれも時間とともに増加する傾向にあり、細胞が漸進的に増殖することが分かる。特筆すべき点として、相関係数 ( $R^2$ ) が 0.997 と非常に高いことから、細胞密度と蛍光シグナル測定値は強い正の線形関係にあるといえる。

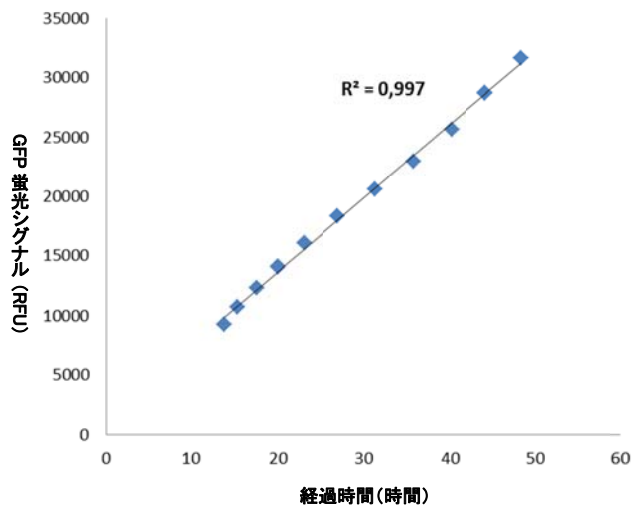


図 5: 細胞密度(X 軸)と蛍光シグナル(Y 軸)の相関関係

## 結論

Spark 20M の細胞密度測定機能は、マイクロプレートウェルにおける細胞増殖を評価するための精度と信頼性の高い手段である。検出した細胞密度と蛍光シグナルの間に高い精度と再現性で線形関係が見られることから、これらの測定感度は同等であるといえる。また、細胞密度測定はラベルフリーで行うため、分析対象となる細胞の他の特徴、特性に干渉することがなく、GFP などの蛍光マーカーでトランスフェクションされていない細胞でも増殖曲線を描くことができる。

さらに、細胞密度測定機能によりウェル底部の細胞分布を容易に観察できることから、細胞移動や再増殖などの新たな用途においても高い精度と再現性を発揮できる。

アッセイ最適化と品質管理に適した測定値が一律に得られるようになり、細胞評価のハイスループット化とアッセイ自動化に向けた真のソリューションがもたらされる。

この新しい細胞密度測定モードを定評のある細胞カウント・生存率測定機能と組み合わせて使うことで、Spark 20M は、細胞研究におけるますます汎用性の高いツールとなる。

## 略語

DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EM	発光
EX	励起
FCS	ウシ胎児血清
GFP	緑色蛍光タンパク質
HEPES	ヒドロキシエチルピペラジニエタンサルホン酸
RFU	相対蛍光単位

※このアプリケーションノートは Tecan (本社 スイス) が発行 (原文英語) し、テカンジャパンが日本語翻訳したものです。

翻訳文の表現等に疑義が生じた場合は、原文をご参照ください。



.....  
**Australia** +61 3 9647 4100 **Austria** +43 62 46 89 33 **Belgium** +32 15 42 13 19 **China** +86 21 28 98 63 33 **Denmark** +45 70 23 44 50 **France** +33 4 72 76 04 80  
**Germany** +49 79 51 94 170 **Italy** +39 02 92 44 790 **Japan** +81 44 556 73 11 **Netherlands** +31 18 34 48 174 **Singapore** +65 644 41 886 **Spain** +34 93 490 01 74  
**Sweden** +46 31 75 44 000 **Switzerland** +41 44 922 89 22 **UK** +44 118 9300 300 **USA** +1 919 361 5200 **Other countries** +41 44 922 8125  
.....

Tecan Group Ltd.では本文書において正確かつ最新の情報をご提供するよう最善の努力を尽くしておりますが、誤謬や脱漏が生じる可能性があります。したがって、Tecan Group Ltd.では明示的または暗示的にかかわらず、本文書における情報の正確性または完全性につき、何らの表明または保証を行うものではありません。また、本文書は予告なく変更する場合があります。記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された仕様書の技術的詳細および詳しい手順については、テカンの担当者までご連絡ください。本文書で取り上げたアプリケーションおよび製品は一部の市場で入手困難な場合がありますので、営業担当者にお問い合わせください。

記載された商標はすべて法律で保護されています。本文書に記載された商標とデザインは、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の商標または登録商標です。完全なリストは [www.tecan.com/trademarks](http://www.tecan.com/trademarks) で参照できます。リストには含まれませんが、ここに記載されている製品名および会社名はそれぞれの所有者の商標である場合があります。

Tecan は、Tecan Group Ltd.(スイス Männedorf)の登録商標です。

Spark 20M は研究用途向けです。

© 2016 Tecan Trading AG スイス 著作権所有 免責事項と商標については、[www.tecan.com](http://www.tecan.com) をご覧ください。

[www.tecan.com/](http://www.tecan.com/) [www.tecan.co.jp](http://www.tecan.co.jp)

399005J V1.0 03-2016

