

## Spark™ 10M 細胞カウントモジュールの性能評価

Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダーと他社製品との細胞カウントの比較

### 緒言

マイクロプレートを用いたセルベースアッセイは、今やライフサイエンス分野の研究において必須である。細胞の急速増殖、毒性、遺伝子発現等の分析によって特定される項目は多岐にわたる。研究分野に関わらず、細胞カウントおよび純度測定は、細胞播種や継代前に実施する必要があるステップであり、それによって分析プロトコルやデータの品質を向上することが可能となる。

Tecan Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダーは、特許出願中の明視野細胞撮像モジュール(セルカウンター)を搭載しており、ディスプレイ Cell Chip™を用いることで、(トリパンブルー色素排除試験法による)ラベルフリーのサイズ分布同定および生存率測定等の細胞カウントが可能となる。この直接的なアプローチが、正確で効率的なプロセスを実現する。各 Cell Chip に2か所のサンプルチャンバーがあり、各チャンバーには 10 µl の細胞懸濁液を入れることができる。4 枚の Cell Chip が Cell Chip アダプター(図1)に挿入でき、それにより、最大 8 サンプルの同時測定を1分45秒弱で実施することが可能である。機器にデフォルト設定された SparkControl™ソフトウェアのワンクリックアプリケーションを使えば、日々のワークフローの中で、信頼性の高い細胞カウントおよび生存率測定が容易になる。



図1: Cell Chip アダプター。4 チップの同時測定が可能。

本アプリケーションノートでは、Spark 10M の細胞カウントモジュールと次の手法との比較を行う。すなわち、(i) C-Chip™ディスプレイ血球計算盤および標準的な顕微鏡を用いたマニュアルカウント、(ii) 比較的高額な画像ベースの細胞カウント機器(機器 A)、(iii) カウント機能を搭載した高性能細胞撮像器(機器 B)。

### 材料及び方法

- Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダー、Cell Chip、Cell Chip アダプター(Tecan、オーストリア)
- C-Chip ノイバウエル型ディスプレイ血球計算盤(PeqLab、ドイツ)

- 機器 A—撮像機能付き細胞カウント機器
- 機器 B—カウント機能を搭載した高性能細胞撮像機器
- GBC(ヒト胆嚢癌)細胞、37°C、5%CO<sub>2</sub>の加湿大気下で、10% v/v FBS、0.1 mg/ml ペニシリン-ストレプトマイシン、1 mM Na-ピルビン酸塩、10 mM HEPES、4 mM L-グルタミンを加えた DMEM(25 mM グルコース)で培養されたもの。

### 実験 1—細胞カウント効率の比較

1X TE を用いて GBC 細胞を培養し、400 g で 3 分間遠心分離機にかけた。細胞ペレットを 10 ml の 10 % FCS DMEM 中で再懸濁し、以下の手法で細胞カウントを行った。

- Spark 10M マルチ検出モードリーダー
- 機器 A
- 機器 B
- C-Chips を用いたマニュアルカウント

Spark 10M リーダーによるラベルフリーの細胞カウントでは、Cell Chip の各サンプルチャンバーに 10 µl の GBC 細胞懸濁液を注入し、各サンプルに対して「測定#1」、「測定#2」を実施した。

SparkControl ソフトウェアによってサンプルチャンバーから 2 段階選抜が行われ、続いてデータの取得、結果の表示が行われた。この間機器設定は一切不要である。続いて、同一細胞懸濁液 10 µl の 2 サンプルに関して、機器 A および機器 B によるカウントおよびノイパウエル型計算盤を用いたマニュアルカウントを実施した(詳述略)。

Microsoft® Excel®を用いてデータ解析を行った。手法ごとに 2 回の測定の平均値および標準偏差を算出し、下記の数式を用いて再現性(%CV)を算出した。

$$\%CV = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

### 実験 2—低細胞数の細胞カウント精度比較

実験 1 の GBC 細胞を用いて希釈系列を作製し、各手法による動的測定を行った。推定細胞濃度の精度を確保するため、4 手法による実験 1 の結果を用いて平均濃度を算出した(1.7 × 10<sup>6</sup> cells/ml)。

希釈係数および対応する細胞数理論値を表 1 に示す。

希釈係数	細胞数 [cells/ml]
不希釈	1.7 × 10 <sup>6</sup>
1:5	3.4 × 10 <sup>5</sup>
1:30	5.6 × 10 <sup>4</sup>

表 1: 実験 1 の GBC 細胞の希釈係数

実験 1 同様の 4 手法を用いて、2 種の無濁液を各希釈で測定した。カウント精度を最大限に確保するため、低濃度液でも Spark 10M リーダーの Flexible エリアセレクション機能を用いて、サンプル毎に 8 画像を取得した。平均値、標準偏差、再現性、細胞数理論値偏差を Microsoft Excel を用いて算出した。

## 結果

### 実験 1—細胞カウント効率の比較

各手法の 2 回の測定を行った実験 1 の結果を表 2 に示す。

手法	測定値 [cells/ml] × 10 <sup>6</sup>		平均値 [cells/ml] × 10 <sup>6</sup>	標準偏差 [cells/ml] × 10 <sup>4</sup>	%CV
	#1	#2			
Spark 10M	1.83	1.85	1.84	0.014	0.76
機器 A	1.83	1.86	1.85	0.021	1.14
機器 B	1.55	1.60	1.58	0.035	2.24
マニュアルカウント	1.62	1.46	1.54	0.113	7.34

表 2: 4 手法による細胞カウントの結果

図 2 に示すように(学生 1 名による t-検定では)手法による有意差は見られなかった。Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダーの細胞カウントモジュールでは、他社機器またはマニュアルカウントと同様の結果を出すことが可能である。

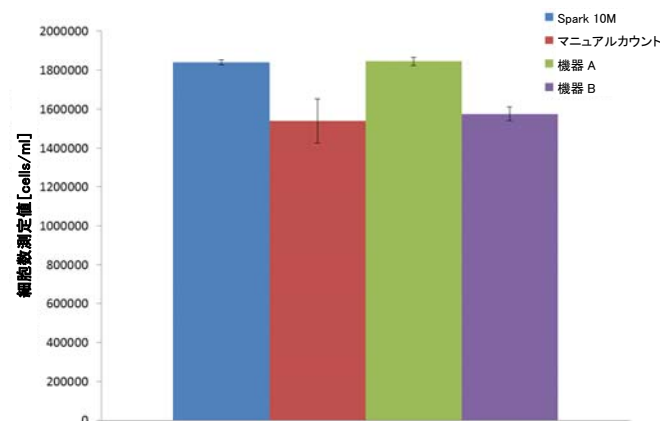


図 2: 4 手法による細胞カウントの結果

### 実験 2—低細胞数の細胞カウント精度比較

不希釈細胞懸濁液 ( $1.7 \times 10^6$  cells/ml)、1:5 希釈 ( $3.4 \times 10^5$  cells/ml)、1:30 希釈 ( $5.6 \times 10^4$  cells/ml) に対して各手法を用いて細胞カウントを実施した結果を表 3 に示す。

$1.7 \times 10^6$	Spark 10M	機器 A	機器 B	マニュアル カウント
測定 #1	1815000	1670000	1700000	1470000
測定 #2	1800000	1540000	1800000	1650000
平均値	1807500	1605000	1750000	1560000
標準偏差	10606.6	91923.9	70710.7	127279.2
% CV	0.6	5.7	4	8.2
目標値からの偏差 (%)	6.3	5.6	3	8.2

$3.4 \times 10^5$	Spark 10M	機器 A	機器 B	マニュアル カウント
測定 #1	418000	405000	550000	360000
測定 #2	439000	413000	460000	405000
平均値	428500	409000	505000	382500
標準偏差	14849.2	5656.9	63639.6	31819.8
%CV	3.5	1.4	12.6	8.3
目標値からの偏差 (%)	26	20.3	48.5	12.5

$5.6 \times 10^4$	Spark 10M	機器 A	機器 B	マニュアル カウント
測定 #1	29000	不可	5500	10000
測定 #2	44900	不可	41000	10000
平均値	36950		23250	10000
標準偏差	11243		25102.3	0
%CV	30.4		108	0
目標値からの偏差 (%)	34.8		59	82.3

表 3: 4 手法による濃度別細胞カウントの結果。  
(%CV および目標値からの偏差を除き) 単位は cells/ml。

不希釈液と 1:5 希釈液に関しては、4 手法を同様に実施したが、細胞濃度が最も低い  $5.6 \times 10^4$  cells/ml (1:30 希釈) 液では、機器 A を使用した測定は実施していない(「濃度が低すぎます」という表示が出たため)。マニュアルカウントの精度は非常に低く、2 つの対象チャンバーそれぞれからカウントできた細胞数は 1 であった。高精度細胞撮像システム搭載の機器 B による測定は可能であったが、測定値に大きなばらつきが出た。測定間で適度な比較可能性が見られたのは、独自の Flexible エリアセレクション機能を搭載した Spark 10M マルチ検出モードプレートリーダーのみであった。

### 要約

細胞カウントは、日々のラボワークに欠かせない作業であり、精度と効率性を兼ね備えた細胞カウント手法を用いることは非常に重要である。Tecan Spark 10M リーダーをマニュアルカウント、他社の同レベル撮像機器 (機器 A)、高価格機器 (機器 B) と比較した結果、 $10^5 \sim 10^6$  cells/ml の細胞懸濁液では、この 4 手法いずれを用いた場合も容易に測定可能で、合理的な再現性があった。各手法による結果には有意差は見られなかったが、マニュアルカウントは非常に時間を要する作業であり、その他の手法に比べて精度も非常に低い。

$10^4$  cells/ml レベルの濃度の細胞懸濁液では、マニュアルカウントおよび機器 A は実用的ではなかった。長期培養後であっても細胞株の増殖が限定的で細胞数が少ない場合、特に問題が生じるということである。Spark 10M リーダーおよび機器 B ではいずれも、この濃度の場合でも合理的な結果が得られたが、機器 B では細胞数理論値からの偏差は大きかった。Spark 10M リーダーの精度の高さを裏付けるのは、低濃度 ( $< 10^5$  cells/ml) サンプルから 8 枚の画像を撮像することのできる Flexible エリアセレクション機能である。

以上の結果から、Spark 10M リーダーは、幅広い濃度の細胞懸濁液に対し、高精度、高効率の細胞カウントを実施することが可能であることが証明された。

## 略語

DMEM	Dulbecco が改変した Eagle 培地
FBS	ウシ胎仔血清
GBC	ヒト胆嚢癌細胞株
HEPES	4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸
TE	トリプシン-EDTA

## 謝辞

We would like to express our thanks to Christian Mayr and Dr Tobias Kiesslich from the Department of Internal Medicine I and Institute of Physiology and Pathophysiology, Paracelsus Medical University/Salzburger Landeskliniken for performing the cell counting experiments.

※このテクニカルノートは 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 2206 3206 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 93 595 95 25 31  
Sweden +46 31 75 44 000 Switzerland +41 44 922 81 11 UK +44 118 9300 300 USA +1 919 361 5200 Other countries +43 62 46 89 33

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によって保護されています。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。

すべての記載された商標は法律で保護されています。本文書で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, Cell Chip は同商標です。

© 2014, Tecan Trading AG スイス 著作権所有

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