

高速高精度セルカウンター マルチ検出モードマイクロプレートリーダーに搭載

Tecan Spark™ 10M マルチ検出モードプレートリーダーに搭載された細胞カウント、生存率測定機能により、細胞系分析の簡易化を実現

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。急速増殖、毒性、遺伝子発現等の分析には、当然ツールとして細胞を使用する。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る。細胞の生死を特定する手法の一つにトリパンプルー色素排除試験法がある。死細胞または細胞膜が損傷した細胞のみが青色に染色され、生細胞、健全細胞と区別する手法である。

Tecan Spark 10M リーダーは、明視野細胞撮像モジュール（セルカウンター）を搭載している。この特許出願中のシステムと合わせて、簡便なディスプレイセル Chip™ を用いることで、ラベルフリーの細胞カウントおよびトリパンプルー系生存率測定等の実施が可能である。各チップには 2 か所のサンプルチャンバーがあり（図 1）、それぞれ 10 μ l の細胞懸濁液の注入が可能である。4 枚の Cell Chip が Cell Chip アダプター（図 2）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。デフォルト設定の高信頼性細胞カウント・生存率測定アプリケーションである SparkControl™ ソフトウェアをワンクリックするだけで、細胞の生死の同定が、マニュアルカウントとは比較にならないほど高速、容易に実施可能となる。

本テクニカルノートでは、Spark 10M マルチ検出モードマイクロプレートリーダー、細胞撮像モジュール、SparkControl ソフトウェア、専用 Cell Counting and Cell Viability Application の機能および特長について詳述する。



図 1: Tecan Cell Chip。サンプルチャンバー 2 か所付き。



図 2: Cell Chip アダプター。4 チップの同時挿入、同時測定が可能。

材料及び方法

- Spark 10M マルチ検出モードリーダー (Tecan, オーストリア)
- Cell Chip、Cell Chip アダプター (Tecan, オーストリア)
- 0.4%トリパンプルー溶液 (Life Technologies, 米国)
- 細胞株:
 - HeLa** (ヒト子宮頸癌細胞, DSMZ, ドイツ)、10%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%Na-ピルビン酸塩、1%HEPES、2%L-グルタミンを加えた RPMI 1640 で培養されたもの。
 - CHO** (チャイニーズハムスター卵巣細胞, DSMZ, ドイツ)、10%FCS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%Na-ピルビン酸塩、1%HEPES、2%L-グルタミンを加えた Ham's F12 で培養されたもの。

細胞は高密度まで培養し、PBS で一度洗浄した。トリプシン/EDTA を用いて培養し、1,400 rpm で 5 分間遠心分離機にかけ、新しい培地で再懸濁した。その後の細胞懸濁液を Cell Chip に注入し解析した。細胞カウント目的としては、細胞懸濁液 10 μ l をチップ上にそのまま注入し、細胞生存率測定目的としては懸濁液 5 μ l とトリパンプルー 5 μ l を混合させて注入した。

SparkControl ソフトウェアに内蔵された Cell Counting and Cell Viability Application を用いて、Spark 10M リーダーで Cell Chip の解析を行った。このアプリケーションにより、高速かつ容易に細胞数および生存率の測定が可能となる。ユーザーはアプリケーション起動画面上 (図 3) で解析対象チャンバーを選択し、「カウント開始」ボタンをクリックするだけで、データ取得が可能となる。



図 3: SparkControl ソフトウェア Cell Counting and Cell Viability Application メインスクリーン

画像およびデータが取得後すぐに表示される (図 4)。画像および細胞サイズヒストグラムならびに算出結果が印刷可能な最終レポートとして自動的に作成される。

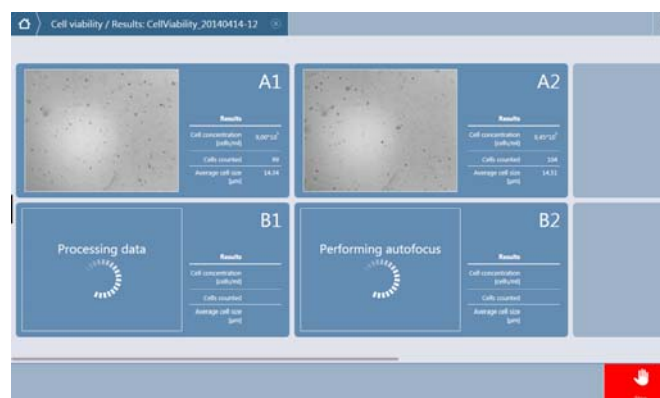


図 4: SparkControl ソフトウェアによるデータ取得中のリアルタイム画面

最大 4 枚の Cell Chip (8 サンプル) の同時解析が可能で、各 Cell Chip 上のサンプルは容易にレプリケートされ、より精度の高い結果の入手が可能となる。レプリケートの平均値を自動計算し、レポートに表示される。

本アプリケーションのデフォルト設定の細胞サイズレンジは 4~90 μ m であるが、対象細胞のサイズによって変更可能である。サイズレンジの変更は測定前後いずれも可能で、変更後、自動的にデータの再解析が実行される。

特に低密度の細胞混濁液の場合、統計精度向上のために、サンプルチャンバーごとに 4 枚または 8 枚の画像を取得することも可能である。これによりカウントされる細胞数が増えるため、より精度の高い結果を出すことが可能となる。

結果

図 5 は、解析結果の PDF 最終レポートの一例である。サンプルおよび手法に関する情報、カウントデータ、画像、ヒストグラムが表示される。結果として特定された細胞濃度は 6.36×10^5 cell/ml で、細胞生存率は 88% であった。ノイバウエル型計算盤を用いて、同一サンプルをマニュアルカウントした結果、細胞濃度は 6.5×10^5 cells/ml、生存率は約 90% であった。

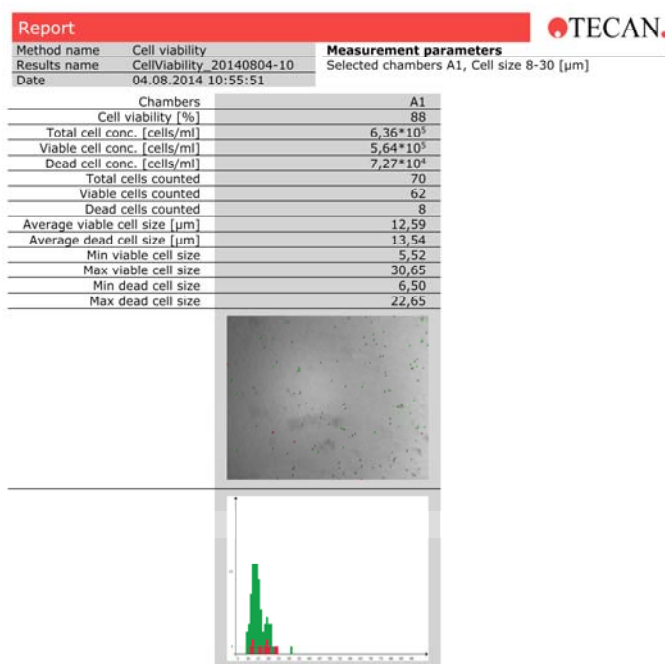


図 5: 全データ、画像、ヒストグラムを表示した PDF レポート

誤差特定

下記の数式のとおり、測定値と基準値（マニュアルカウント）を用いて、システムの誤差を算出することができる。

$$\text{誤差} = \frac{(\text{平均測定値} - \text{平均マニュアルカウント値})}{\text{平均マニュアルカウント値}} \times 100$$

CHO 細胞、HeLa 細胞両方に関して、細胞濃度別に、各サンプルにつき画像 1 枚または 8 枚を使用して細胞カウントを行い、それぞれ基準測定法で得られた測定値との比較を行った（表 1）。

細胞タイプ	濃度 (cells/ml)	誤差 (%) 各サンプルにつき 画像 1 枚	誤差 (%) 各サンプルにつき 画像 8 枚
CHO	4×10^6	4.71	1.79
CHO	4.7×10^5	7.89	4.23
CHO	3×10^4	43.94	11.46
HeLa	4.2×10^6	5.49	1.50
HeLa	5.5×10^5	13.52	7.37

表 1: 細胞濃度別の細胞カウント誤差。
サンプルごとに画像 1 枚の場合と 8 枚の場合のデータ比較。

低濃度の場合、Spark 10M のセルカウンター精度は、サンプル毎に 1 枚の画像の場合と比べて 8 枚の場合、大幅に向上した。高濃度 ($\geq 1 \times 10^7$ cells/ml) では、画像枚数による精度差は（データ上）見られなかった。

再現性の特定

再現性とは、同一条件下で複数回測定を行った場合の変動の度合いのことであり、下記の数式を用いて算出される。

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

本システムの再現性を特定するために、4 枚の Cell Chip の両方のチャンバーに同一細胞懸濁液を 10 µl 注入し、5 回測定を行い、1 回の測定につき、サンプルごとに 1 枚または 8 枚の画像を取得した。得られたデータを用いて、再現性を算出した（表 2）。

細胞タイプ	濃度 (cells/ml)	%CV 各サンプルにつき 画像 1 枚	%CV 各サンプルにつき 画像 8 枚
CHO	1×10^6	5.65	1.73
CHO	1×10^5	9.04	4.70
CHO	1×10^4	15.65	8.51
HeLa	1×10^6	3.63	2.00
HeLa	1×10^5	13.08	8.18
HeLa	1×10^4	20.00	10.42

表 2: 細胞濃度別の細胞カウント再現性。
サンプルごとに画像 1 枚の場合と 8 枚の場合のデータ比較。

要約

本実験の結果、Spark 10M マルチ検出モードリーダーは、細胞数および生存率測定を行う高精度、高速ツールであることが示された。Spark 10M マルチ検出モードリーダーを用いた解析はマニュアルカウントに比べて再現性においても非常に高いことが明らかになった。

また、低濃度サンプルの測定精度および再現性は、サンプル毎に複数の画像を取得することで大きく向上することが判明した。撮像および解析は全チャンバー同時に実施されるため、8 サンプルに対して、サンプルごとに8枚の画像を1分45秒弱で解析することが可能である。したがって、マニュアルカウントと比較して、高再現性かつ高処理能力の作業が可能となるのである。

※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 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, SparkControl, Cell Chip は同商標です。

© 2014, Tecan Trading AG スイス 著作権所有

www.tecan.com www.tecan.co.jp/spark