

細胞カウントをより正確に行うための 5つのコツ

細胞カウントは面倒な作業ですが正確に行う必要があります。それはマニュアルであっても自動であっても、企業、アカデミア問わず同じことです。信頼できるカウント結果が実験上不可欠だからです。それを手助けするコツがここにあります。長年マニュアルで細胞カウントをしていた方にとっては驚かれる事実もあるかもしれません。この資料を読めばより早く、より正確な細胞カウント結果を得ることができるようになるでしょう。そしてもしかしたら Corning セルカウンター（カタログ番号 6749）を使うことで細胞カウントがもう少し楽しい作業になるかもしれません。



Tip #1 : サンプル調製 : 細胞カウントを改善する最初のステップ

マニュアル、自動問わず細胞濃度を確認するためには適切なサンプルを使用する必要があります。不適切なサンプルが不正確なカウント結果の原因になることは言うまでもありません。不適切なサンプルをカウントしないためにできることは何でしょうか?以下の3つのステップで、作業者間のばらつきを低減し、より正確な結果を得ることができます。

プロトコルの標準化

各作業者はトリプシン処理からピペッティングの仕方まで、独自の細胞カウント手法を持っているものです。施設全体でプロトコルを標準化し、各作業者がそれに従って作業を行っているかを定期的に確認すべきです。これによりサンプル間の細胞カウントの正確さが向上します。

全員がこのやり方に慣れるまでには時間がかかるかもしれませんが、より正確なカウント結果が得られることは、長い目で見てより良い研究結果と節約につながります。

均一な懸濁液の調整

サンプルをカウントする際、サンプル中の細胞分布は均一であることを前提に一部を抜き取ります。しかし細胞懸濁液は短時間静置しただけでも細胞が沈み、濃度勾配が生じます。そうなるとどこからサンプルをとってもそれはサンプルの代表にはならないのです。

ボルテックスを使用したり、チューブを指でタッピングすることで再度均一に懸濁させましょう。作業者によってはピペッティングで再懸濁する場合があります。いずれにしても、その方法は施設内で統一しましょう。

細胞片の混入を防ぐ

ほとんどの細胞カウントサンプルにおいていくらかの細胞片が存在します。これは正しく認識されていなければカウント時の判定ミスの大きな要因になります。たとえば、細胞片が生細胞とカウントされる（偽陽性）、もしくは生細胞が細胞片とみなされてカウントされない（偽陰性）などです。

このような結果の正確さを向上させるにはサンプル中に混入する細胞片を減らすことです。もしくはマニュアル細胞カウント時の細胞片判定に関するトレーニングを実施したり、自動システムの場合は検出パラメーターを改善するなどにより正確な結果を得ることができます。

結論

サンプルをベストな状態にし正確な結果を得るためにはプロトコルの標準化を徹底し継続的にそのプロトコルを運用することです。それによりサンプル調製のミスを防ぎ、作業者間のばらつきを低減することができます。また、細胞懸濁液はできる限り均一の状態にすることに注意を払い、細胞片を混入させないことで細胞カウントの正確さはかなり向上するでしょう。

Tip #2 : セルカウントにかかるトータルコストへの理解

マニュアルでの細胞カウントの手順はシンプルです：細胞を回収、希釈し、血球計算盤に流し込んで顕微鏡を使って目視でカウントします。細胞培養の基礎知識があれば誰もができる作業です。そして正確なカウント結果を得られる安価な方法です。しかし、これが本当に最も安価な方法でしょうか？

マニュアルでの細胞カウントを正確に行うためにはある程度の経験が必要です。生細胞と死細胞の区別や細胞の塊と細胞片の判別などをマスターするには時間とトレーニングを要します。研究室での生産性を向上するために自動セルカウンターが開発されました。自動化システムを導入するにはそれに見合った費用がかかります。ここで少し考えてみましょう。マニュアルでの細胞カウントは本当に自動細胞カウントより低コストでしょうか？

どちらの初期費用がより経済的？

どのカウント方法を採用するにせよ、3つのコストファクターを考慮しなければなりません。それは、初期費用、ランニングコスト（例 消耗品）、人件費です。購入費用については、マニュアル細胞カウントが最も低コストです。必要な道具はガラス製のカウンティングチャンバーと計数器だけなので \$185*程度で購入できます。これには一般的な明視野顕微鏡を含んでいませんが、顕微鏡は研究室の一般備品であるためここでは新規購入品とはみなしません。ランニングコストはカバーガラスくらいで、1枚あたりせいぜい \$0.025*です。要するに、非常に低コストでセットアップができます。ではなぜ自動セルカウンターが経済的に魅力があるのでしょうか。それは、マニュアルカウントと自動カウントそれぞれにかかる人件費を考えるとわかります。

カウント頻度で変化

熟練した作業者でもマニュアル細胞カウントに最低 4 分かかります。一方自動細胞カウントであれば数秒で完了します。これは作業にかかる人件費を大幅に削減します。それはカウント頻度が上がればより顕著になります。

自動セルカウンターの初期費用は約 \$3,700*ですが、カウント頻度が上がるほど投資対効果が上がります。自動セルカウンターは消耗品が高価なことが多いので、ランニングコストは上がります。自動セルカウンター専用のディスプレイスライドはマニュアル細胞カウントで必要となるカバーガラスの約 15 倍もの費用がかかります。

* 2018 年時点の米国市場価格。

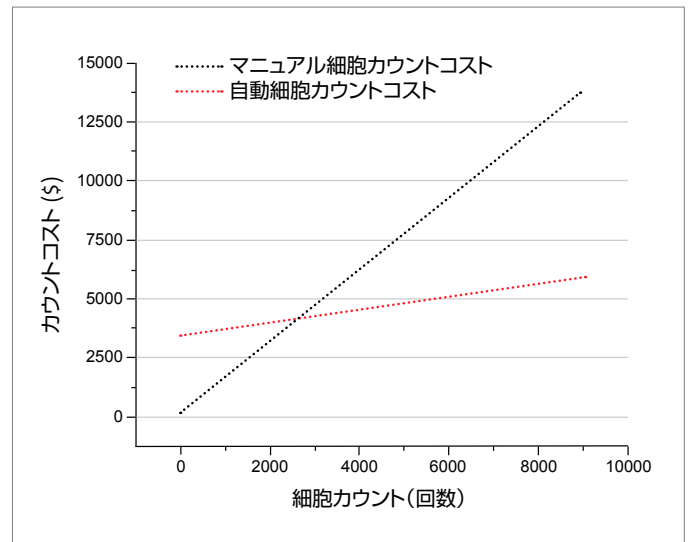


図1 マニュアル細胞カウントと自動細胞カウントのトータルコストを示した。いずれも一般的な購入コスト、ランニングコスト、人件費を含む。損益分岐点は約 2,600 カウントであった

これらの情報を総合すると、マニュアル細胞カウントと自動細胞カウントの初期費用、ランニングコスト、人件費のトータルコストを計算すると、マニュアル細胞カウントがより高コストに変わる損益分岐点が現れます（図 1）。

結論

細胞カウントのセットアップにかかる初期費用は、何を導入するかを決定するときには確かに重要です。しかし、初期費用だけで決めてしまうことは長期的により多くのコストを費やす可能性を秘めています。あらゆるコストを考慮し、より経済的な細胞カウントシステムを選択してください。

購入費用、ランニングコスト、人件費は各研究室によって異なりますので、状況に合った比較検討をお勧めします。つまり、損益分岐点もまた条件により大きく変動しますし、場合によってはマニュアルと自動化システムでほとんど差がないかもしれません。

Tip #3 : ほんの少しのお手伝い

マニュアル細胞カウントの手順はシンプルです：細胞を回収し、カウントするだけです。しかしこれは間違いやすい手順でもあります。ピペットの使い方を失敗したり、トリプシンを入れすぎたり。もしかしたら計算を誤ってフラスコに細胞が全くなかったなんてこともあるかもしれません。全ての知識が完全に頭に染みついているとは限らないのです。

時間と経験とともに細胞カウントの達人になっていきます。それでも時には臨機応変な対応が求められることがあります。たとえば、T-175 フラスコの在庫がたまたまなくなってしまう、細胞を維持するために急に T-25 フラスコを使わなければならなくなった？ T-25 フラスコには何 mL 入れればよかったでしょうか？

そんなささいな問題をその場で解決する細胞濃度チャートシートがあります。このチャートは、計算式だけでなく、フラスコに関する一般的な情報も載っています。このチャートは下のボタンからダウンロードできます。

チャートのダウンロード

Tips #4 : セルカウンターの正確さについて

研究室で機器を購入する際に最も重要な要素がその正確さです。ここで問われるのが、果たしてどのようにそのシステムの正確さを検証するのか、ということです。そして、「precision (精度)」、「trueness (真度)」、「accuracy (正確さ)」の違いは何かということです。この3つの言葉は同様の場面で見られることがありますが、全く異なった意味をもちます。

まずはじめにそれぞれの定義について確認しましょう。ISO 5725 では、測定方法の正確さを表すために真度と精度の二つの用語を用いています。真度は、多数の測定結果の平均値と、真の値又は参照値との一致の程度を示すものです。精度は、測定結果の間の一貫性の程度を示すものです。正確さ (accuracy) という用語は、この規格においては、真度と精度の両方を表すために使われています。*

“accuracy” はかつては、現在は真度と名付けられている一つの要素だけのために使われていましたが、これは系統効果だけでなく、偶然効果による参照値からの総合的なへだたりを含めるべきであるということが、多くの人々に認知されるようになってきました。*

かたよりは、極めて長い間、統計的事項として扱われてきており、それが (医師、弁護士などの) 専門的職業の人々の間で思想的反発を生じていましたが、真度 (trueness) という用語を用いることにより、積極的な見方が強調されるようになりました。*

測定の繰返しによる変動に対する一般用語は精度です。多くの事例で、併行条件と再現条件と名付けられた二つの精度の条件が必要であり、測定方法のばらつきを記述するのに役に立つことが知られています。精度は、通常標準偏差の形で表現されます。

まとめると、真度と精度が高いデバイスが正確な結果を出せるということです。

セルカウンターの真度の測定方法

セルカウンターの真度とは、デバイスの測定値の平均が実際の細胞濃度とどのくらい近いかということです。そのためには既知濃度のサンプルで測定する必要があります。

また、セルカウンターは濃度範囲の両極で異なる動作をする可能性があることを忘れてはいけません。そのうえでいくつかの既知濃度に希釈したサンプルを用いて真度検証の測定を行います。これでキャリブレーションカーブが得られます。

このカーブで特定の濃度だけではなくすべての濃度範囲におけるセルカウンターの真度がわかります。

キャリブレーションカーブが得られたら、真度の高いセルカウンターは以下二点を示します。

- ▶ 測定濃度と理論値が直線関係にある。
- ▶ お互いの傾きが近い。

* www.iso.org より抜粋

セルカウンターの精度の測定方法

これで真度の検証方法はわかりました。次はセルカウンターの精度について説明します。前述したとおり、セルカウンターの精度はいかに信頼できるシステムであるかを証明するものです。つまり、同じサンプルを複数回測定した時に同様の測定値が得られるかどうかです。

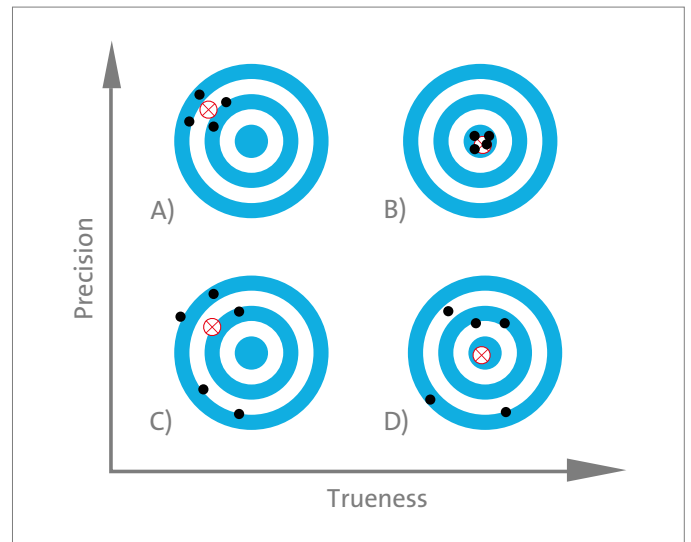


図 2. 正確さに対する真度と精度の関係

- (A) 精度のみが高くと、実際のサンプルより少なく計測したり、多く計測する可能性があります。
- (B) 精度、真度ともに高く、正確なシステムと言えます。
- (C) 精度、真度ともに低いと正確さは損なわれます。
- (D) 真度のみが高くと、平均値をとると正確ですが、サンプル数が必要になります。

統計学的にこれは変動係数 (coefficient of variation, CV 値) で表され、Equation 1 のように算出されます。σが標準偏差、 \bar{x} が測定データの平均値です。

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Equation 1})$$

算出された CV 値は Equation 2 により算出した理論 CV 値と比較します。理論 CV 値は精度を検証する際の基準値となります。

測定 CV 値は理論値とより近い方がよく、また理論 CV 値より低くなることはありません。測定 CV 値は、理論 CV 値に加えてシステムや作業者に起因するエラーにより標準偏差が大きくなることで増加します。

$$CV_{Th}(\%) = \frac{\sqrt{n}}{n} \cdot 100\% = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot 100\% \quad (\text{Equation 2})$$

まとめ

セルカウンターの正確さを検証する方法を説明しました。正確さは精度と真度 2 つの構成要素からなること、これらの要素が細胞カウントのシステム上のパフォーマンスに対してどのように関係しているのかがわかりただけははずです。これらの情報から、メーカーが提供する情報を基にテスト検証することができます。

デバイスの真度を調べるためには、キャリブレーションカーブを作成しましょう。真度の高いセルカウンターは測定濃度と理論濃度が直線関係になります。

精度については、メーカーが提供する CV 値を確認し、理論値と比べましょう。CV 値は常に理論値より低くなります。

Tip #5 : マニュアルから自動化への移行

自動セルカウンターやマニュアル細胞カウントに先入観を持っている人は少なくありません。まず最も大切な質問です。

「何をカウントしたいですか？」

この質問に答えることでどのカウント方法が最適であるかがおのずと決まってきます。一つの細胞タイプを一日に何度もカウントする、もしくは幅広い細胞タイプやバクテリアをカウントしているなど、人により様々です。また、マニュアルと自動化どちらを導入するかを決めるときは、カウントする細胞タイプにかかわらず以下4つの要素を考慮します。

コスト

マニュアル細胞カウントは初期費用が最も低く、またチャンバーを再利用できるという点ではランニングコストを最も低く抑えられる方法です。特にカウント頻度が少ない場合は予算的に見るとベストな選択肢と言えます (Tip #2 参照)。

しかし、ここには隠れたコストが発生しています。作業者が細胞カウントにかかる時間とマニュアル細胞カウントの技術を習得するのに費やす時間のコストです。そのコストはカウント頻度に応じて大幅に増加します。

自動細胞カウントでは、初期費用が導入の大きなハードルとなります。マニュアル細胞カウントと比べて 1,000 倍ものコストがかかるからです。利点はサンプルごとの処理速度を大幅に短縮できることです。ただし消耗品に追加コストがかかってくることもあります。

自動セルカウンターで大量の細胞カウントを実施する場合であれば、これら消耗品にかかるコストは、初期費用を大きく上回ります。それでもなお、カウント数が多くなれば自動細胞カウントの方が人件費の削減という理由でマニュアル細胞カウントより低コストになり得るのです。

正確さ

マニュアル、自動問わず、カウント結果は正確でなければなりません。マニュアル細胞カウントの長所はその汎用性、正確な判断、早期に問題発見ができる点です。なぜなら作業者は直接細胞を目視しているため、問題が発生するとすぐに気づくことができるからです。

しかし、作業者によるマニュアル細胞カウントは時に欠点にもなりえます。主観に基づくカウント結果は、作業者間のばらつきを大きくする可能性があります。たとえ同じ血球計算盤の同じ区画をカウントしていても、カウントプロトコールは作業者ごとに異なる可能性があるのです。

自動セルカウンターはその点で利点があります。マニュアル細胞カウントで起こるような作業者の主観に影響を受けず、サンプルごとのカウント誤差が低いからです。また、自動であるため、マニュアル細胞カウントに比べて高い再現性を備えています。

しかし、細胞の分類に関しては作業者と同じような感覚がないため、誤分類の発生率は高くなります。つまり自動化システムは精度は高いものの真度が低くなるため、実際濃度より低い結果が出る可能性があります。

汎用性

マニュアル細胞カウントはシチュエーションに応じて柔軟に対応できるので、汎用性は非常に高いと言えます。それは同時に作業者による制約を受けるということでもあります。作業者による制約とはカウントに掛かる時間やカウント方法の習得などです。

自動細胞カウントはサンプルのハイスループットに対応し、より多くのカウントを行うことができます。それにより高い生産性を得られ、サンプル間のばらつきを抑えます。ただし特定のシステムではその汎用性に制限がかかります。

レポート

マニュアル細胞カウントのレポート手法は 19 世紀に血球計算盤が登場した時から変わっていません。作業者はラボノートに結果を手書きで書くだけです。

自動化システムについて言うと、レポート手法は進化し続けています。カウント結果についてのより多くの情報を高速でレポートできるようになっています。現在の自動化システムは、セルカウントのグラフなど、マニュアルでは得られないより詳細な分析結果を提供します。さらにクラウドデータ保存によって作業者は後からデータを再分析することもできます。これによりデータの見逃しがなくなります。

結論

自動化とマニュアルのどちらにするかを決める前に、まずはどんな細胞をカウントするかを考えてください。カウントする細胞のタイプとその頻度が明確になったらどちらの方法が利用可能なのかがますますわかります。そして、コスト、正確さ、汎用性、レポート内容などの項目と実際の必要要件との関連性を含め、マニュアルと自動化のそれぞれの特徴から検討してください。

全ての情報をあなたの置かれている状況に照らし合わせてどのシステムが最適かを決定してください。引き続きマニュアルカウントをすることがベストな選択かもしれないし、もしかしたら自動細胞カウントを導入するという結論が出るかもしれません。

Tip

新しく細胞カウントシステムを導入するときは、できる限りトライアルを行い、その仕様が希望に合っているかを確認しましょう。Corning® セルカウンターはデモンストラーションを受付けています。ご希望の際は下記サイトからお申込みいただくか、弊社営業担当までお問合せください。

<https://www.corning.com/jp/jp/products/life-sciences/resources/webforms/lab-equipment-request.html>



- ・価格は2019年7月現在のものです。価格は税抜き価格で記載しております
- ・商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承ください。
- ・For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks
- ・All other trademarks in this document are the property of their respective owners.
- ・保証・免責事項：特に記載がない限り、記載中の製品は研究用機材および試薬です。診断、または治療用途には使用しないでください。また人体には使用しないでください。コーニングライフサイエンスは本製品の臨床または診断用途でのいかなるパフォーマンスについても保証しません。

CORNING

FALCON

AXYGEN

PYREX

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

技術サポートへのお問い合わせは
Tel : 03-3586-1268
ScientificSupportJP@corning.com