Corning® セルカウンターのオートフォーカス機能を使用した哺乳動物細胞カウント

アプリケーションノート

CORNING

Zhang Linyu, Wang Xuebin, and Chen Rui
Corning Incorporated, Life Sciences, Asia Technology Center
Shanghai, China

はじめに

特定の細胞集団における細胞生存率の評価は、分子生物学研究室で行われる基本的かつ不可欠なプロセスである。

Corning セルカウンターは自動化されたクラウドベースのセルカウンターで、最新の光学系画像と直感的に操作可能な画像解析ツールを利用している。マニュアルカウントと画像に基づく自動カウントそれぞれの優れた特性を組み合わせた革新的なデザインである。カウントアルゴリズムはユーザーのニーズに合わせて改良していけるように設計されている。つまりクラウドの特性を利用することで、製品のライフサイクル全体を通して機能拡張を行うことができる。発売後に追加された機能には、ヒストグラム、ゲーティング、プロジェクトサマリーの PDF 形式エクスポート、クラスターの生存率検出強化などがあるが、これらに限定されない。その一環として、Corning セルカウンターにオートフォーカス機能が追加された。この資料では、10 ～ 70 µm の哺乳動物細胞の細胞濃度を正確に測定するバリデーション試験について報告する。

材料と方法

3 種類の細胞株（Vero、K562、MSC）を用いて Corning セルカウンター（カタログ番号 6749）を用いたオートフォーカスとマニュアルフォーカスによる細胞カウントの精度を比較した。Vero 細胞は 10% FBS 添加 DMEM で培養した。K562 細胞は 10% FBS 添加 RPMI-1640 で培養した。MSC は MSC 用の Xeno-free 培地で培養した。

Vero 細胞や MSC などの接着細胞は、TrypLE™ Express Enzyme（Thermo Fisher 12604039）で剥離させた後、1,000 rpm で 3 分間遠心分離した。ペレットを PBS で再懸濁し、シングルセル懸濁液とした。浮遊細胞の一種である K562 細胞は、培養液を遠心分離して回収した後、ペレットを PBS で再懸濁した。

細胞懸濁液にトリパンブルー（Thermo Fisher T10282）をマニュアルに従い 1：1 の割合で添加し混合した。この混合液 10 µL を Corning カウンティングチャンバー（カタログ番号 480200）に注入した。このチャンバーを Corning セルカウンターのステージ上に置いたアダプタープレートにセットした。

細胞のマニュアルフォーカスでは、Corning セルカウンターの取扱説明書（CLS-AN-486）に従って最適なフォーカスが得られるまで、ノブを時計回りまたは反時計回りに回した。細胞のオートフォーカスでは、「AF」アイコンを選択して細胞懸濁液に対しクラウドベースのオートフォーカスを行った。

本試験では、Corning セルカウンターのオートフォーカスとマニュアルフォーカスを用いて、各種細胞で 3 サンプルをカウントした。

結果と考察

Vero 細胞のカウント

細胞をカウントした領域（1.39 mm²）の画像例を図 1 に示した。CytoSMART app もしくは CytoSMART クラウドの post hoc ヒストグラム機能を用いて下限ゲートを 6 µm に設定した（図 2）。Corning セルカウンターを用いてオートフォーカスとマニュアルフォーカスにより Vero 細胞の 3 サンプルをカウントした。生細胞濃度と生存率の結果を図 3 に示す。これら 2 つのフォーカス法で取得した結果を比較すると、生細胞濃度と生存率のデータはオートフォーカスとマニュアルフォーカスで同様であった。

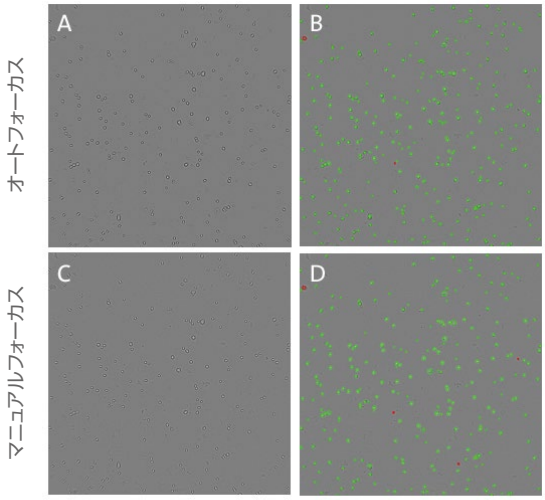

図 1. オートフォーカス後またはマニュアルフォーカス後に細胞をカウントしたときの Corning セルカウンター画像。（A および C）カウント前に正しく焦点を合わせた画像。（B および D）カウントの結果。生細胞（緑色）、死細胞（赤色）。小さい細胞や細胞片は、アルゴリズムやユーザー指定のゲーティングによってカウントから除外される（図 2 に例を示す）。

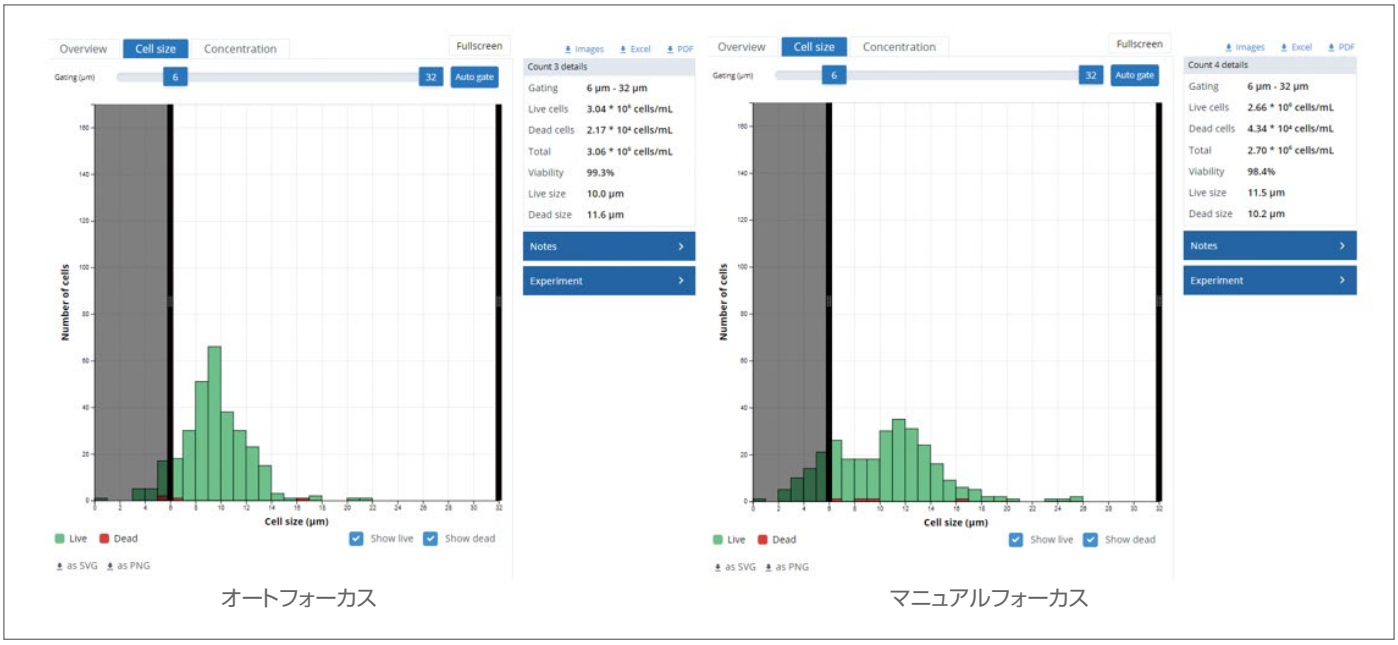

図 2. 細胞径を 6 µm にゲーティングしたヒストグラム（Vero 細胞）。この閾値を下回る細胞はカウントから除外される。死細胞（赤いバー）と生細胞（緑のバー）を切り替えて、各部分集団を別々に計測することも可能。

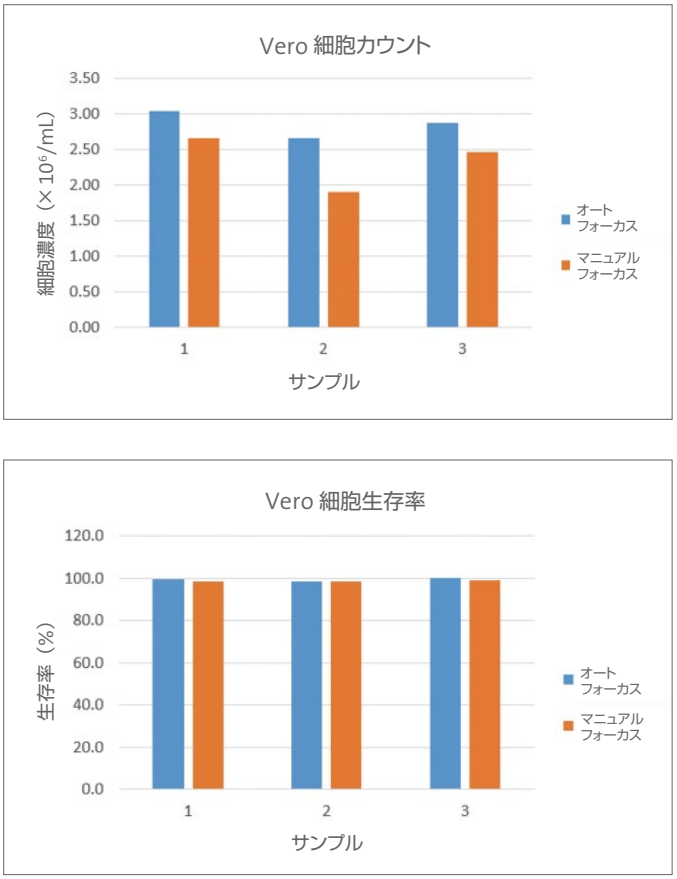

図 3. オートフォーカスとマニュアルフォーカスによる Vero 細胞の細胞濃度と生存率

MSC のカウント

細胞をカウントした領域（1.39 mm²）の画像例を図 4 に示した。CytoSMART app もしくは CytoSMART クラウドの post hoc ヒストグラム機能を用いて下限ゲートを 6 µm に設定した（図 5）。Corning® セルカウンターを用いてオートフォーカスとマニュアルフォーカスにより MSC の 3 サンプルをカウントした。生細胞濃度と生存率の結果を図 6 に示す。これら 2 つのフォーカス法で取得した結果を比較すると、生細胞濃度と生存率のデータはオートフォーカスとマニュアルフォーカスで同様であった。

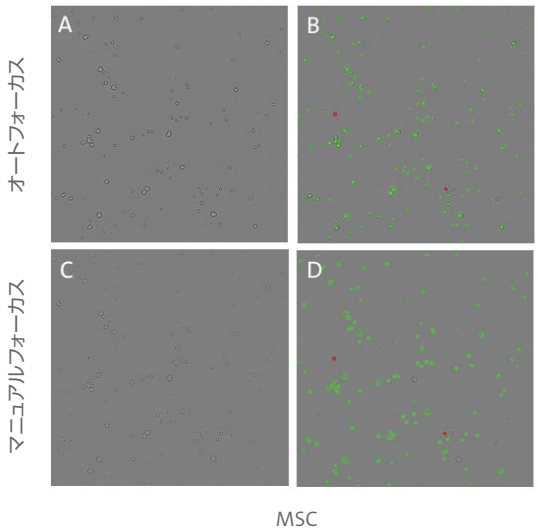

図 4. オートフォーカス後またはマニュアルフォーカス後に細胞をカウントしたときの Corning セルカウンター画像。（A および C）カウント前に正しく焦点を合わせた画像。（B および D）カウントの結果。生細胞（緑色）、死細胞（赤色）。小さい細胞や細胞片は、アルゴリズムやユーザー指定のゲーティングによってカウントから除外される（図 5 に例を示す）。

図 5. 細胞径を 6 µm にゲーティングしたヒストグラム（MSC）。この閾値を下回る細胞はカウントから除外される。死細胞（赤いバー）と生細胞（緑のバー）を切り替えて、各部分集団を別々に計測することも可能。

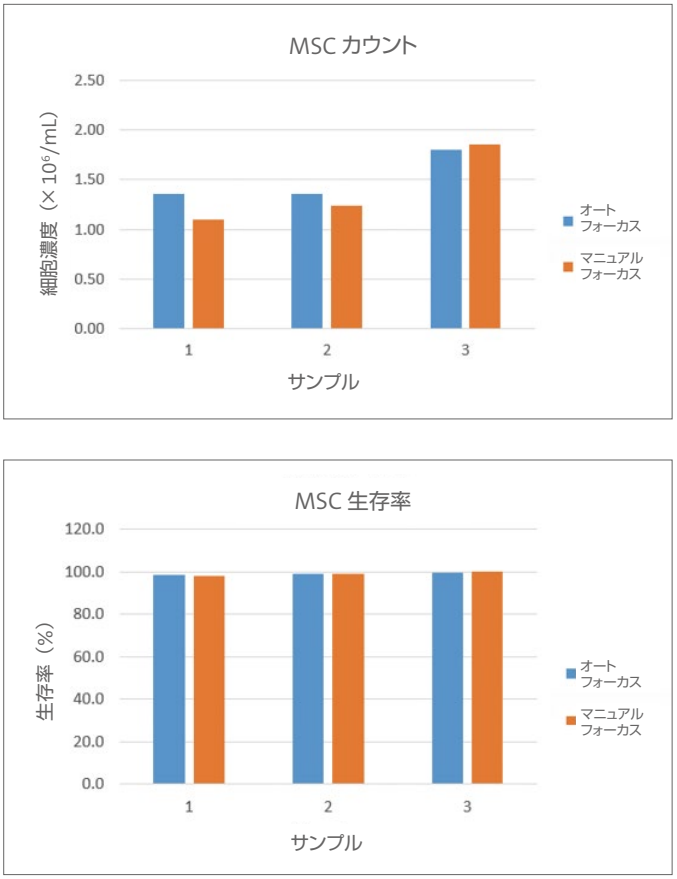

図 6. オートフォーカスおよびマニュアルフォーカスによる MSC の細胞濃度および生存率

K562 細胞のカウント

細胞をカウントした領域（1.39 mm²）の画像例を図 7 に示した。CytoSMART app もしくは CytoSMART クラウドの post hoc ヒストグラム機能を用いて下限ゲートを 5 µm に設定した（図 8）。Corning® セルカウンターを用いてオートフォーカスとマニュアルフォーカスにより K562 細胞の 3 サンプルをカウントした。生細胞濃度と生存率の結果を図 9 に示す。これら 2 つのフォーカス法で取得した結果を比較すると、生細胞濃度と生存率のデータはオートフォーカスとマニュアルフォーカスで同様であった。

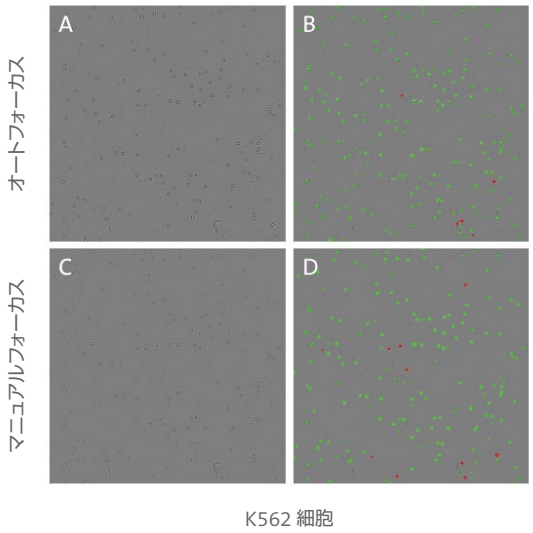

図 7. オートフォーカス後またはマニュアルフォーカス後に細胞をカウントしたときの Corning セルカウンター画像。（A および C）カウント前に正しく焦点を合わせた画像。（B および D）カウントの結果。生細胞（緑色）、死細胞（赤色）。小さい細胞や細胞片は、アルゴリズムやユーザー指定のゲーティングによってカウントから除外される（図 8 に例を示す）。

図 8. 細胞径を 5 µm にゲーティングしたヒストグラム（K562 細胞）。この閾値を下回る細胞はカウントから除外される。死細胞（赤いバー）と生細胞（緑のバー）を切り替えて、各部分集団を別々に計測することも可能。

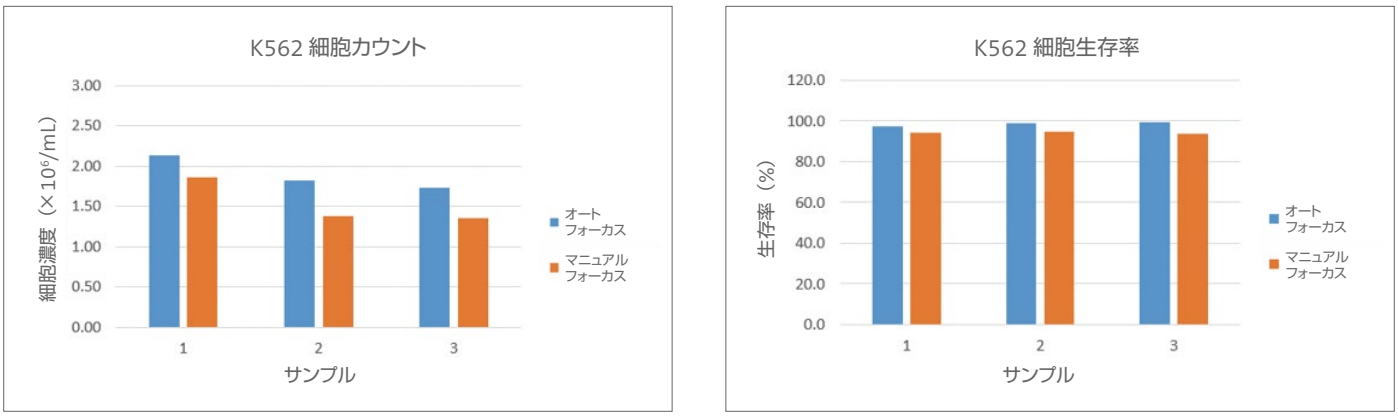

図 9. オートフォーカスおよびマニュアルフォーカスによる K562 細胞の細胞濃度および生存率

結論

- Corning® セルカウンターは、哺乳動物細胞の細胞生存率と濃度を迅速かつ正確に測定することができる。
- 細胞サイズ 10 ～ 70 µm における細胞濃度と生存率の結果は、オートフォーカスとマニュアルフォーカスで同様である。
- オートフォーカス機能は使いやすく、作業時間の短縮や、ユーザー間のばらつきを減らすことができる。

- 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 www.corning.com/lifesciences/trademarks.
  All other trademarks 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

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

©2022 Corning Incorporated

CLS-305-00
CLS-AN-658
R0-2205-000-B