

Corning® セルカウンターを用いた 3D 細胞培養の解析

CORNING

アプリケーションノート

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

はじめに

オルガノイド、スフェロイドおよび三次元 (3D) 細胞培養モデルは、疾患モデリングや再生医療をはじめとして多くの分野での応用が見込まれる^{1,2}。オルガノイドは臓器特異的細胞から成る複雑なクラスターである。その構造は幹細胞または前駆細胞に由来し、足場となる細胞外基質内で自己集合する。これにより、顕微鏡で観察できるサイズの特定臓器の細胞集団を作成でき、3D での研究が可能となる。一方、スフェロイドは様々な細胞タイプが集まった単純なクラスターで、足場を必要とせずに、細胞間接着を介して 3D 細胞の凝集塊を形成する。スフェロイドとオルガノイドはいずれも複数の細胞から構成され、3D 細胞培養研究の基盤となる特性を有している。

現在、オルガノイドやスフェロイドのマニュアルカウントは、多くの研究室にとって日常的な作業だが、時間がかかり、結果は作業者に左右される。不規則な三次元サンプルでは、カウントだけでなく、サイズやサイズ分布のデータの収集にも作業者によるばらつきが生じる。今回紹介するコーニングの自動化ソリューションに搭載されたオルガノイドカウント機能は、正確なオルガノイドおよびスフェロイドの測定を可能にする。Corning セルカウンター (カタログ番号 6749) は、オルガノイドカウント用ソフトウェア (カタログ番号 6749-OC) を追加することで、3D 対象物の濃度や表面積のデータを迅速に取得することができる。

材料と方法

スフェロイドの形成

Corning Elplasia® プレート (6 ウェル、ラウンドボトム、カタログ番号 4440) を用いて、MRC5 細胞株からスフェロイドを作製した。10% FBS 添加 DMEM (カタログ番号 10-013-CV) 中で MRC5 細胞を培養し継代した。細胞回収の際は、T75 フラスコ (カタログ番号 430641U) に 0.25% Trypsin-EDTA (カタログ番号 25-053-CI) 3 mL を添加して接着細胞を剥離した後、同量の血清添加培地を用いて、トリプシン消化を停止させた。

Corning Elplasia プレートの Corning 超低接着 (ULA) 表面は複数のマイクロキャビティを有し、ウェル内で多量の均一なスフェロイドを形成することができる。Corning Elplasia プレート (6 ウェル、ラウンドボトム) は 1 ウェルにつき最大 2,885 個のスフェロイドを形成できる。播種する細胞濃度を調整することにより、様々なサイズのスフェロイドが得られる。この試験では、様々なサイズのスフェロイドを作製するために、各マイクロキャビティにつき 50、100、200 個の MRC5 細胞 (それぞれ、小、中、大スフェロイドとして定義) を使用した (1 ウェルにつきそれぞれ約 1.44×10^6 、 2.89×10^6 、 5.77×10^6 細胞)。細胞をウェルに播種し、5% CO₂、37°C で培養した。2 日間培養すると、各マイクロキャビティ内にスフェロイドが形成された (図 1A ~ 1C)。

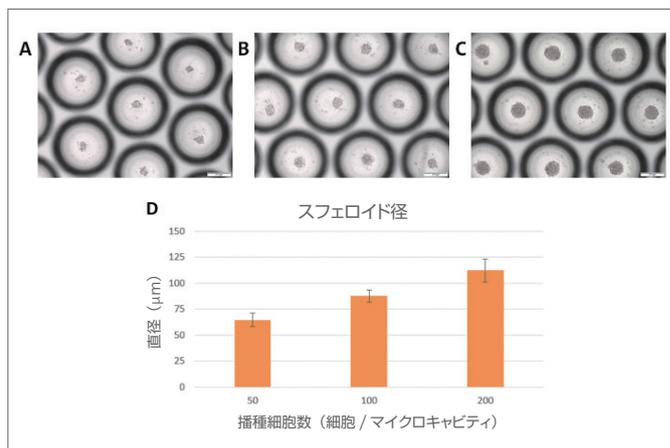


図 1. Corning Elplasia プレートに形成された均一なスフェロイド。MRC5 細胞を Elplasia プレートに播種し 48 時間培養すると、細胞は凝集してスフェロイドを形成した。スフェロイドのサイズは最初の播種密度に依存した。マイクロキャビティあたり 50 細胞 (A)、100 細胞 (B) および 200 細胞 (C)。 (D) 各スフェロイドの直径は Image J ソフトウェアで測定した。画像は Olympus IX53 顕微鏡を用いて倍率 100 倍で取得した。スケールバーは 200 μm。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) を示す。

スフェロイドのカウント

カウント用のスフェロイド懸濁液を得るために、スフェロイドを穏やかに吸引し、培地に添加して懸濁した後、15 mL 遠沈管に移した。2 つのウェルからスフェロイドを採取し (約 5,000 個)、200 × g で 3 分間遠心した後、PBS 100 μL に再懸濁した。

Corning セルカウンター (カタログ番号 6749) のオルガノイドカウント用ソフトウェア (カタログ番号 6749-OC) を使用して、スフェロイドの濃度とサイズを自動測定した。3D サンプル用カウンティングチャンバー (カタログ番号 480201) の深さは 0.2 mm で、直径 10 ~ 200 μm のスフェロイドやオルガノイドに適合する。カウンティングチャンバーにスフェロイド懸濁液 20 μL を添加し、セルカウンターにセットして解析した。コーニングの自動化ソリューションでは、ユーザーが自身の 3D サンプルの形態に基づいてアルゴリズムのバージョンを選択できる。オルガノイドカウント用ソフトウェアの Version 1 は不規則な形態のサンプルに、Version 2 は球形のサンプルに使用するのに適している。ここで示すデータは、オルガノイドカウント用ソフトウェアの Version 2 を用いて測定した。

マニュアルカウントの場合は、Corning® 384 ウェル ハイコンテンツイメージング用マイクロプレート (カタログ番号 4681) の 1 ウェルにスフェロイド懸濁液 10 μ L を添加し、スフェロイドを顕微鏡下で観察しながら注意深くカウントした。マニュアルカウントの結果をもとに濃度を算出した。

この実験では、Corning セルカウンターのマルチカウント機能を用いて 1 回につき 1.5 \times 1.5 mm の 8 つの視野のデータを平均した。マニュアルカウントでは、各サンプルにつき 384 ウェル マイクロプレートの 3 ウェルをカウントした。

結果と考察

Corning Elplasia® プレート (6 ウェル、ラウンドボトム) に、MRC5 細胞を 1 マイクロキャビティあたり 50、100、200 細胞の密度で播種した。48 時間培養後、細胞は凝集し均一なスフェロイドを形成した (図 1A ~ 1C)。スフェロイドの直径を測定し (図 1D)、 $S = \pi \times (d/2)^2$ の式を用いてそのサイズを算出した (図 4)。

Corning Elplasia プレートの 1 ウェル中に 2,500 個以上のスフェロイドが形成された。2 つのウェルからスフェロイドを回収し、PBS 100 μ L に再懸濁した。理論的には、サンプルの濃度はおよそ 5×10^4 スフェロイド/mL になる。Corning セルカウンターおよびマニュアルカウントによりサンプルの濃度を測定した (図 2)。

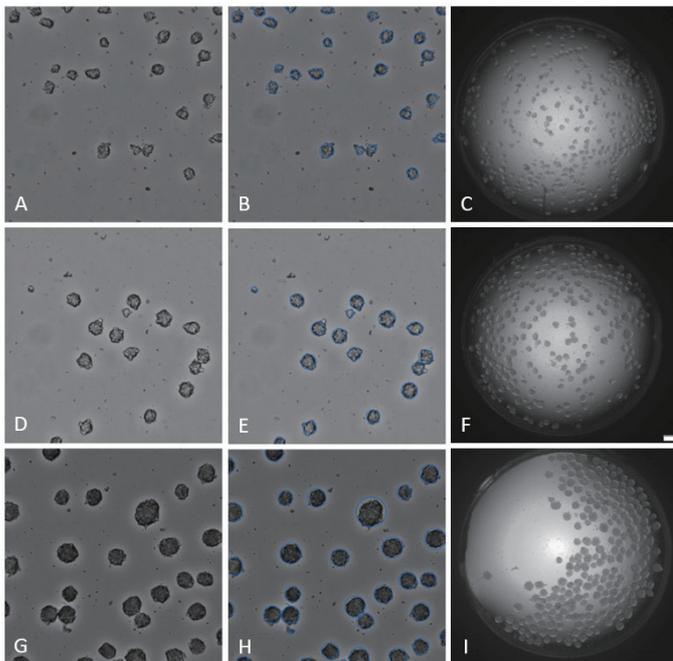


図 2. Corning セルカウンターおよびマニュアルカウントを用いたカウント画像。(A ~ C) 50 細胞 / マイクロキャビティで形成されたスフェロイド。(D ~ F) 100 細胞 / マイクロキャビティで形成されたスフェロイド。(G ~ I) 200 細胞 / マイクロキャビティで形成されたスフェロイド。(A、D、G) カウント前のスフェロイドの明視野画像。(B、E、H) 画像解析アルゴリズムを用いて解析したスフェロイドの明視野画像 (このアプリケーションではゲートを 1,000 μ m² とした)。(C、F、I) Olympus IX53 顕微鏡下で取得した 384 ウェル マイクロプレートのウェル中のスフェロイドの明視野画像。

2 つのカウント法を比較すると、Corning セルカウンターを用いて測定した平均濃度の方が、理論値より近い値となった (図 3)。スフェロイドのサイズも同じ機器を用いて測定した。図 4 に示すように、Corning セルカウンターを用いて測定したスフェロイドサイズと計算上の直径が一致した。これらの結果は、スフェロイドの正確なカウントには Corning セルカウンターが適していることを示している。

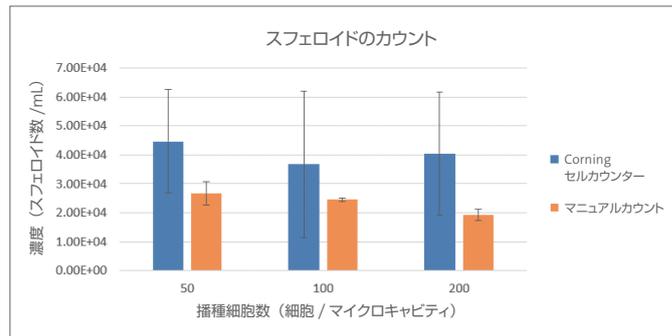


図 3. Corning セルカウンターとマニュアルカウントを用いて算出したスフェロイド濃度。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す。

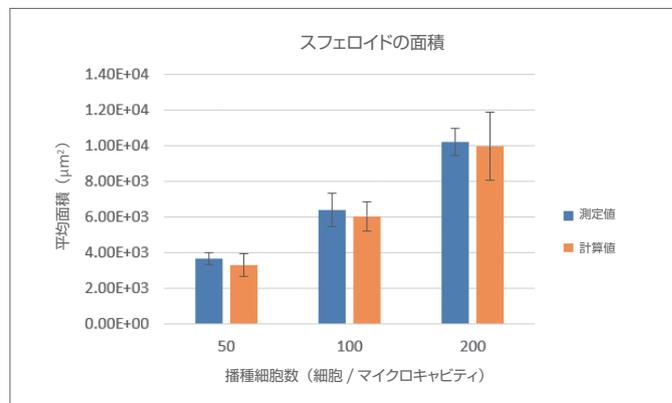


図 4. Corning セルカウンターとマニュアルカウントを用いて算出したスフェロイド面積。データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) を示す。

結論

- ▶ オルガノイドカウント機能を備えた Corning セルカウンターは、スフェロイドまたはオルガノイドの迅速かつ正確なカウントを可能にする。Corning セルカウンターはマニュアルカウント法に代わる方法である。
- ▶ 画像解析アルゴリズムにより、広範囲のサイズのオルガノイドまたはスフェロイドを検出することができる。サンプルのサイズとカウント結果は、ユーザー自身で出力することができる。
- ▶ Corning セルカウンターは、マニュアルカウントと比較してより正確なスフェロイド / オルガノイドのカウントが可能である。

References

1. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR Jr. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 19;13(4):874.
2. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov*. 2017 Jun;22(5):456-472.

- ・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