

Rapid Determination of Cell Number of Attached Cells

接着細胞の細胞数の迅速な定量

Introduction 序論

細胞数の迅速な定量は、多くのバイオテクノロジープロセスやアッセイのために重要です。

例えば、細胞数は細胞の継代培養の重要なパラメータです。

加えて、細胞数は多くの細胞ベースのアッセイにおいて明確な結果をもたらす役割を持ちます。例えば、細胞増殖アッセイにとっての決定的な結果として、あるいは、蛍光ベースのアッセイの信号強度の解釈のための重要な変数として扱われます。

しかしながら、接着細胞の場合、細胞数の直接的定量のためには、伝統的にそれらの細胞の剥離と単細胞懸濁液への分離を必要とします。この手順は多くの欠点を持ちます：その手順は労働集約型で、時間がかかり、変動に影響されやすく、そして、細胞死を引き起こす細胞ストレスを与える可能性があります。

このアプリケーションノート・ノートでは、核染色を介して直接的に、または、接着細胞層によって覆われる表面領域を細胞数に変換することにより間接的・無侵襲に、接着細胞の細胞数が Cellavista システムを利用することで迅速かつ容易に決定できるかについて説明します。

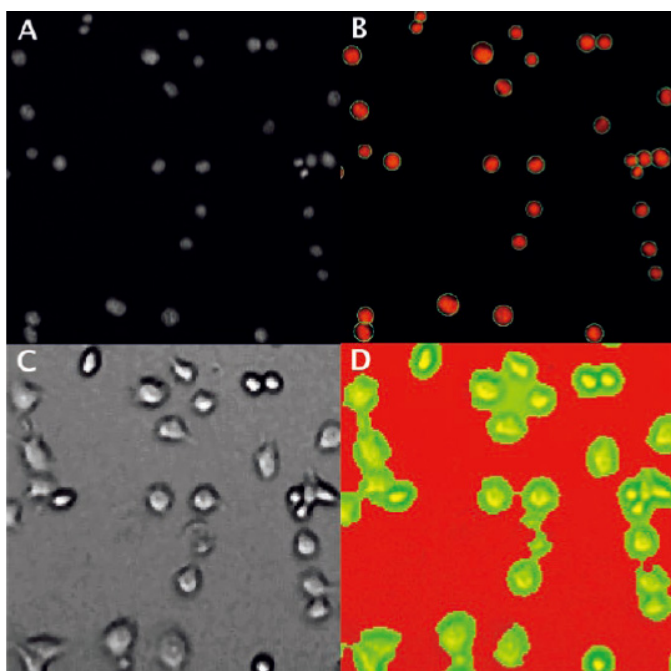


図 1:

- (A) Hoechst 33342(ヘキスト染色(DNA を青色蛍光で可視化))で染色された、マウス皮膚由来線維芽細胞-3T3 細胞の核の蛍光画像 (10 倍対物レンズ)
- (B) セクション(A)に対する画像解析結果 (「Nuclei Count」) のオーバーレイ
- (C) 同じセクション(A)からの明視野画像 (4 倍対物レンズ)
- (D) セクション(A)の明視野画像に対する画像解析結果 (「Cell Confluence」) のオーバーレイ

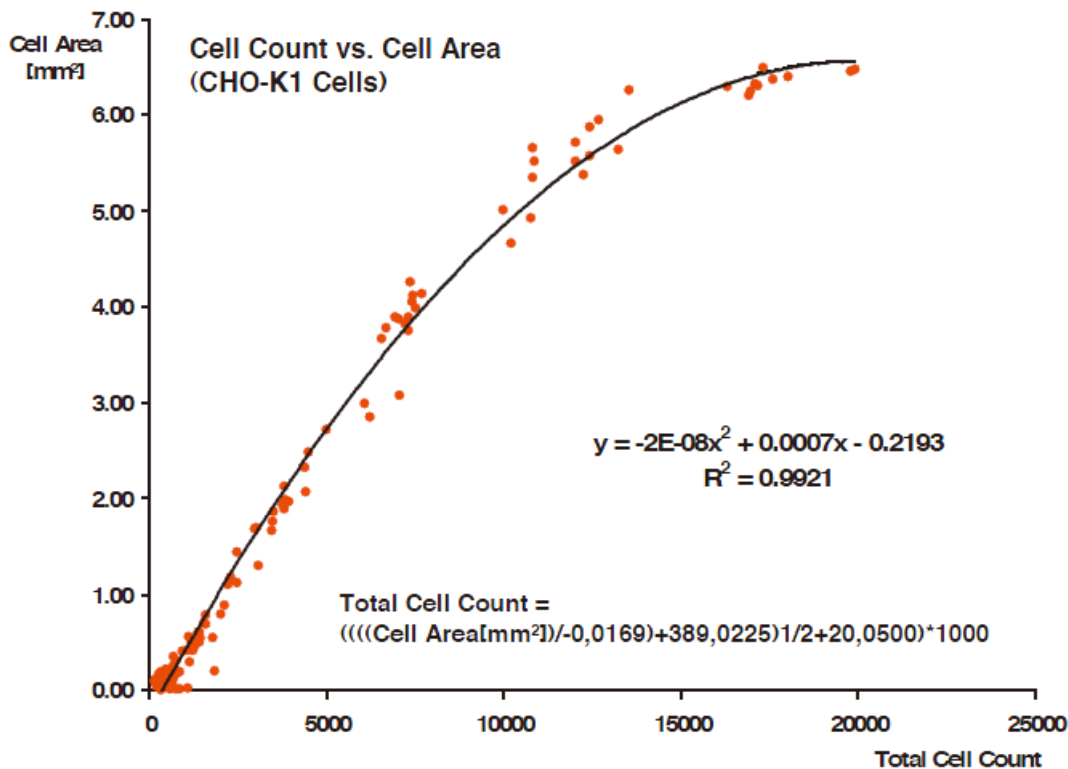
Methods 方法

2つの細胞株（チャイニーズハムスター卵巣細胞 亜種 CHO-K1 とマウス皮膚由来線維芽細胞-3T3）の希釈系列（希釈媒体：DMEM+10% FCS）を作成し、その結果として、それぞれの細胞株について、約 200~200,000 細胞 mL⁻¹ 範囲の 14 種類の濃度にししました。それぞれの細胞株・濃度から、80 μL を 10 ウェルの中へピペットで移しました。384 ウェル・マイクロプレート（Corning 社製 カタログ # 3712）のうち 140 ウェルを、それぞれの細胞株のために使用しました。384 ウェル・マイクロプレートを、標準細胞培養条件（37℃、5%CO₂、相対湿度 95%）下のインキュベーターで一晩保存しました。

次の日、培養液を除去し、膜透過性・DNA インターカレーション色素であるヘキスト（Hoechst 33342）を 2 μg mL⁻¹ 濃度で含んだ培養液（60 μL）に置き換え、細胞核を染色しました。

先に述べた同じ条件下での 20 分の培養の後、すべてのウェルについて、最初に、Cellavista 明視野「Cell Confluence」アプリケーション（4 倍対物レンズ使用）に続き、蛍光「Nuclei Count」アプリケーション（10 倍対物レンズ使用、蛍光オプション：バイオレット）を用いて計測しました。いずれのアプリケーションについても、すべてのウェルのウェル全体を画像化し、解析しました。

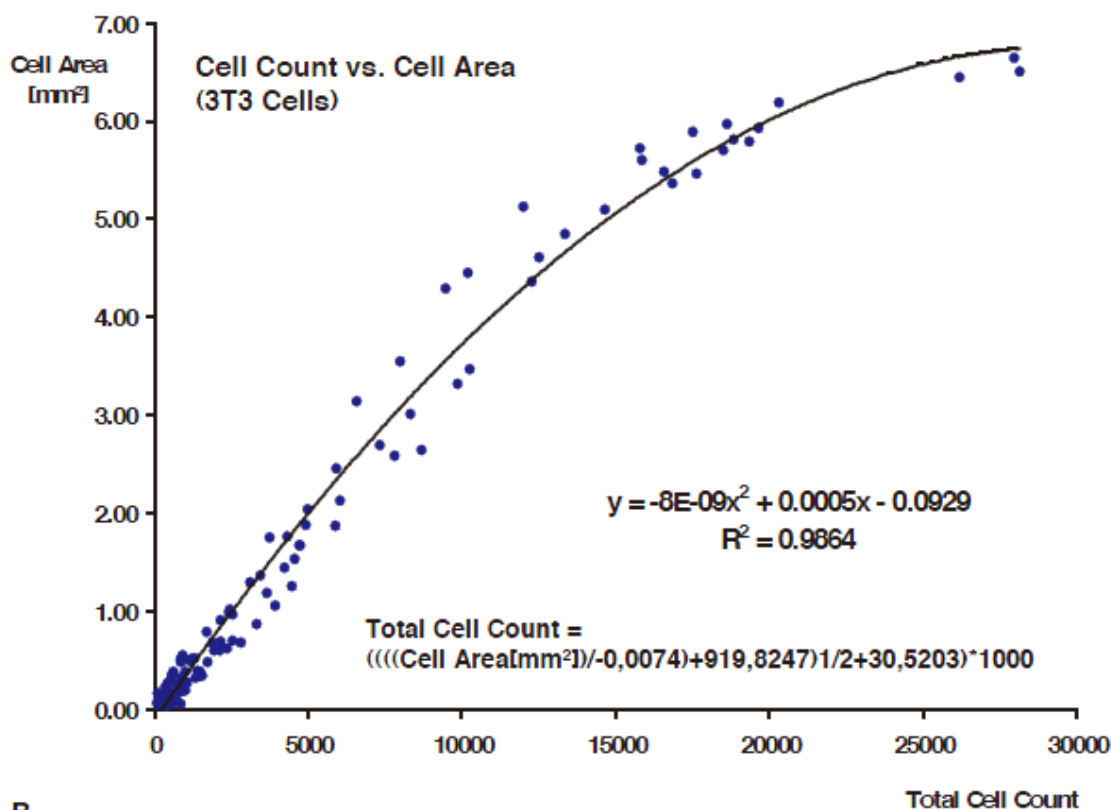
細胞数 対 面積 (CHO-K1 細胞)



A

⇒合計細胞数 = (((細胞面積[mm²]) ÷ -0,0169) + 389,0225) × 1/2 + 20,0500) × 1000

細胞数 対 面積 (3T3 細胞)



B

⇒合計細胞数 = (((細胞面積[mm²]) ÷ -0,0074) + 919,8247) × 1/2 +30,5203) × 1000

図 2 :

Cellavista 計測に基づく、全細胞数 (「Nuclei Count」アプリケーション) と細胞面積 [mm²] (「Cell Confluence」アプリケーション) 間の相関。

二次回帰分析から導き出される相関関数、その逆関数と相関係数の R² 値も同様に表示されます。

(A) CHO-K1 細胞の相関

(B) 3T3 細胞の相関

Results 結果

図 1 は、接着性のマウス皮膚由来線維芽細胞-3T3 細胞を含むひとつのウェルの例を用いて、解析の原理を例示しています。

明視野解析は、接着細胞に覆われた領域についての結果を算出しますが、同じ領域に対する蛍光解析では、細胞核の数 (つまり細胞数) を検出します。細胞核数の精度を決定するために、8つの画像からの染色された細胞核を手動で計数し、結果を、「Nuclei Count」アプリケーションによる Cellavista の解析結果と比較しました。Cellavista は手動の計数と比較して、+/- 6.2%の精度で細胞核数 (細胞数) を決定しました。

図 2 は、定量された細胞数と細胞密集度間の相関を示します。

グラフは、両方の細胞株について、~ 0.5 mm² と ~ 6.5 mm² (細胞密集度範囲 約 7 - 95% に対応) の間における密集度 (細胞面積 (mm²)) と細胞数の相関が、二次回帰関数によって近似されることを表しています。

決定された関数は、非常によく細胞数と細胞領域間の相関を確立します。そして、それは相関係数 (R²) が非常に「1」に近かったという事実によって示されます。

Conclusions 結論

今回行われた実験は下記の事を示します。

1. Cellavista は、シンプルな核染色と「Nuclei Count」アプリケーションを用いて、迅速かつ確実に、マイクロプレートのウェル全体において、直接的な接着細胞数の測定に利用することができる。
2. Cellavista は、細胞面積結果を細胞数に変換することを可能にする、相関関数の決定に利用できる。
3. 相関関数はシンプルな方法でアルゴリズムに直接組み込むことができるため、Cellavista によるウェル全体からの細胞密集度結果は、無侵襲の方法（すなわち、蛍光染料の添加なしで）で、細胞数に直接変換できる。

この原理は、他のタイプの培養容器（例えば 96 ウェルプレート、小さな T-フラスコまたはロボ・フラスコ）や、他の細胞株にも適用できます。

References 参考文献

- 1 Cellavista Application Note
“High throughput cell confluence determination assay for proliferation and toxicity studies”



日本総代理店：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル9F
Phone：【本社】03-3816-0851(代表) 【大阪】06-6310-8077
E-mail：sales@primetech.co.jp