

Guava® Muse™ セルアナライザーによる 簡便で高精度な細胞計数と生存率測定 — Muse™ Count & Viability Kit —

はじめに

細胞濃度と生存率の評価は、セルヘルスの特徴を解析する上で重要です。これらの情報は、細胞増殖速度のモニタリング、細胞の増殖条件の最適化、細胞毒性の評価などでデータを標準化する際に有用です。しかし、これらのデータを取得する際、従来の手法では複雑な機器を要したり、単一の色素染色のために細胞分解に伴う様々な細胞状態を区別できないことがありました。

Guava® Muse™ セルアナライザーは、包括的なセルヘルス情報を迅速かつ確実に取得するために開発されました。本装置は、単一のプラットフォームを使用して多項目のセルヘルス分析を可能にする堅牢な細胞解析装置です。Guava Muse セルアナライザーはシンプルかつ直感的なタッチスクリーンインターフェースで細胞の取得・分析を可能にする一方、細胞濃度、生存率、セルヘルス、細胞内シグナル伝達の測定や、免疫細胞の同定も行うことができます。また、そのコンパクトなサイズと使いやすさで、世界中のさまざまな分野の研究者がセルヘルスの包括的な測定を実施しています。

Guava Muse セルアナライザーは、マルチパラメータによる蛍光検出とマイクロキャピラリーフロー技術で個々の細胞の特性解析を行ない、最小限の細胞数で細胞サンプルの高感度かつ迅速な評価を実現します。

図1. 単一プラットフォームによる多項目のセルヘルス測定



Muse™ Count & Viability Kitは、細胞濃度と生存率を迅速に測定できるシンプルで高感度なアッセイキットです(図2)。このアプリケーションノートでは、細胞計数と生存率の測定結果について、トリパンブルーを用いた従来法とGuava Muse セルアナライザーを用いた結果を比較し、Guava Muse セルアナライザーのパフォーマンスが従来法よりも向上していることを紹介します。

Guava Muse セルアナライザーを用いたアッセイの特長

1. 正確で高精度の測定を実現
2. 持ち運び可能かつ省スペース設計
3. サンプルと専用試薬を混ぜてプロトコルに沿って測定するとすぐに結果を取得できるため、複雑なワークフローから解放される
4. 二つの蛍光色素を組み合わせた専用キットで生細胞と死細胞の識別が可能
5. 少量サンプルで測定できるのでサンプル量を節約できる
6. 浮遊細胞や接着細胞を含む様々な細胞種で測定検証済み

Muse Count & Viability Kitを用いたアッセイは、混合済みの2つのDNA染色蛍光色素を使用します(図2)。これらの色素のうち、一つは細胞膜透過性のDNA染色試薬であり、すべての細胞核を染色します。もう一方の色素は、細胞膜が壊れて細胞死に至る細胞の核や、死細胞の核を選択的に染色します。この組み合わせにより、死細胞または死に至る細胞から生細胞を区別でき、正確で信頼性の高い細胞濃度と生存率の結果が得られます。染色されたサンプルの測定については、サンプルの取得ステップが示されるタッチスクリーンインターフェースを見ながら実施します。Muse Count & Viability アッセイは、オプションのプロット表示で結果を簡単に確認できます。すべての有核細胞(生細胞と死細胞)を明確に識別する二重蛍光プローブを用いるため、従来の比色法と比較して感度と精度が向上します。

図2. Muse™ Count & Viability Kit アッセイのワークフローと原理

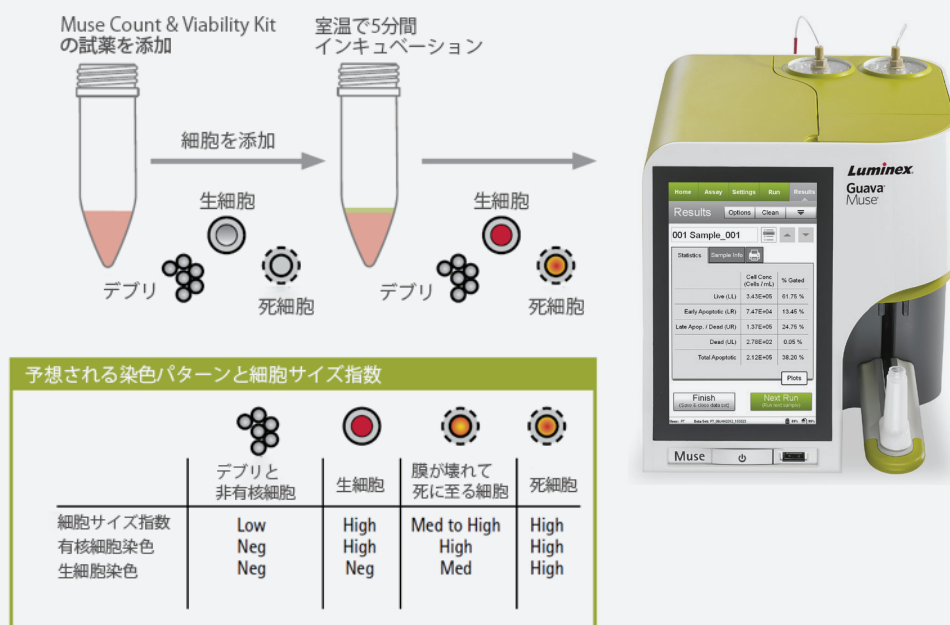


図2. このアッセイでは、2つの蛍光DNA染色色素を含む試薬を利用して、細胞濃度と生存率を測定します。二つの蛍光色素のうち一方の膜透過性色素が全細胞核を染色し、核を含まない細胞由来のデブリと区別します。もう一方の色素は細胞膜が損傷して死に至る細胞の核や死細胞の核を染色します。死に至る細胞と死細胞は両色素で染色されますが、死に至る細胞の蛍光強度は死細胞のそれよりも蛍光強度が低減します(図2の下段のパネル)。

材料および方法

Muse Count & Viability Kitを用いたアッセイは、非常に簡素化されたワークフローで細胞数と生存率を測定します(図2)。サンプル調製はMuse Count & Viability Kitの試薬を加えるだけの簡単なプロトコールです。サンプルの測定データは、Muse Count & Viability Kitのソフトウェアモジュールを用いて迅速に取得されます。

アッセイのワークフローがタッチスクリーン上に表示されます(図3)。まず、Muse Count & Viability モジュールにある「Run Assay」を押します。タッチスクリーン上に表示されるサンプルロードの指示に沿って測定設定の最適化と確認を行ないます。次にサンプル情報を入力し、「Run Sample」を選択します。自動計算された濃度がスクリーン上に表示され、ドットプロットの結果を確認するオプションやサンプル間のマーカー調整画面が表示されます(図3の画像)。

データは重要な測定情報とともに装置内に保存され、レポートまたはマイクロソフト エクセルファイルとしてエクスポートできます。測定結果のパラメータには次の情報が含まれます。

- 体積 (mL) あたりの生細胞数
- 生細胞数の割合
- 1mLあたりの総細胞数
- 総生細胞数
- 総細胞数
- 希釈係数 (値を入力)
- オリジナルボリューム (値を入力)
- サンプル番号
- サンプルID

図3. ガイド付きインターフェースによる細胞の取得・分析操作のステップ

Select Module
↓
Load Sample
↓
Adjust Settings
↓
Acquire
↓
View Results



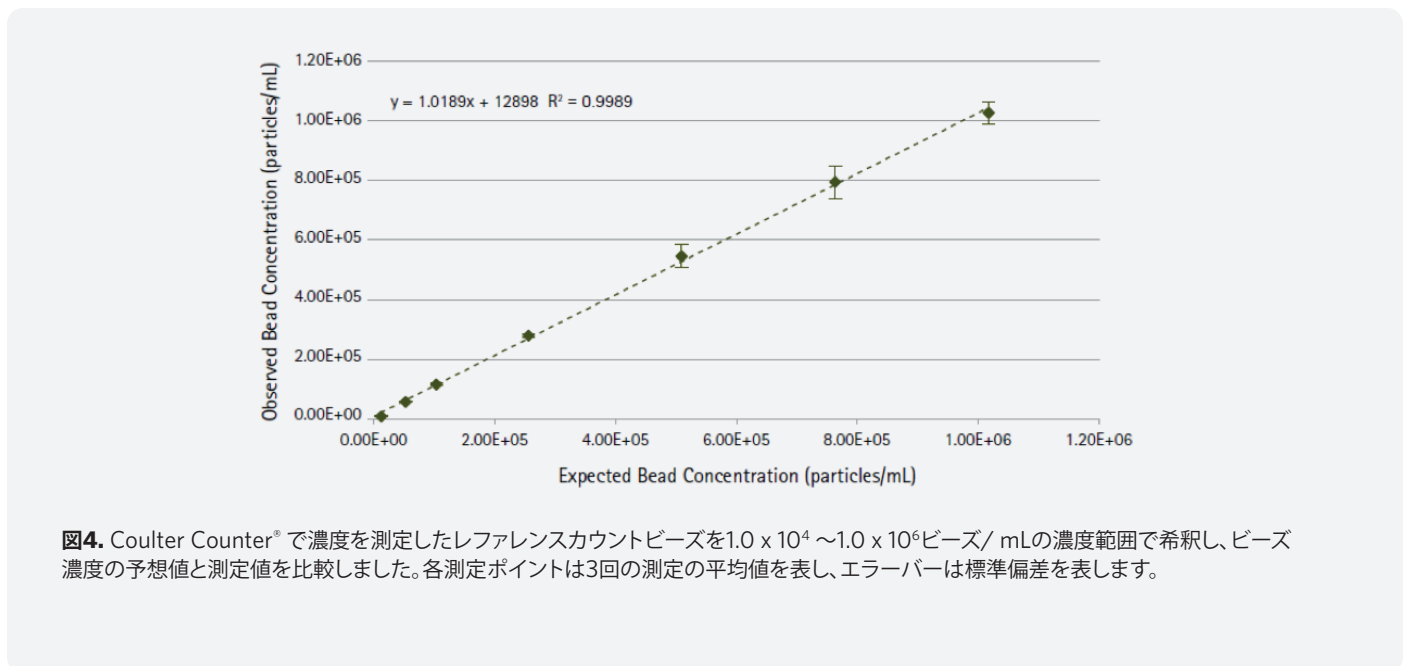
図3. 細胞濃度と生存率の結果は細胞の取得が完了すると自動的に表示されます。オプションのドットプロット表示により、結果の視覚化と詳細なデータの分析が可能です。

結果

計数の正確性

Guava Muse セルアナライザーによる計数の正確性と希釈直線性は、複数の濃度で調製されたレファレンスカウントビーズの計測値で検証されています。図4は、Guava Muse セルアナライザーを用いて $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ ビーズ/mLの範囲で調製されたビーズの濃度の予想値と実際の測定値を比較しています。回帰直線の勾配と相関係数はどちらも1に近く、ここで測定した濃度範囲でGuava Muse セルアナライザーを使用すると正確な計数と線形性が得られることが示されました。

図4. Guava Muse セルアナライザーによるレファレンスカウントビーズの正確な計数



汎用性:さまざまな細胞株への適用

Muse Count & Viability Kitを使用して、浮遊細胞と接着細胞を含むいくつかの細胞株の細胞濃度を測定しました。図5は測定した5つの細胞株で判明した細胞濃度と予想細胞濃度の比較を示しています。理論濃度は元の細胞サンプルの段階希釈に基づいて計算され、Guava Muse セルアナライザーを用いて実際の濃度を確認しました。測定したすべての細胞株の濃度勾配と R^2 値が1に近いことから、様々な細胞種において希釈直線性が得られることが実証されました。

表1は、Muse Count & Viability アッセイキットでこれまでに検証した細胞株の一覧です。浮遊細胞株と接着細胞株の各々で得られたデータは、さまざまなサンプル濃度で正確な計数結果と生存率情報を示しました。

表1. Guava Muse セルアナライザーで測定した細胞株

細胞株	接着/浮遊	由来	供給元
Jurkat	浮遊	急性T細胞白血病-ヒト	ATCC TIB-152
HL-60	浮遊	前骨髄球性白血病-ヒト	ATCC CCL-240
HB-8307	浮遊	B細胞骨髄腫-ヒト	ATCC HB-8307
CHO	接着	卵巣-チャイニーズハムスター	ATCC CCL-61
SF9	浮遊	卵巣(昆虫)-ツマジロクサヨトウ	Invitrogen 11496-015
K562	浮遊	慢性骨髄性白血病-ヒト	ATCC CCL-243
MCF-7	接着	乳腺癌-ヒト	ATCC HTB-22
HeLa	接着	子宮頸部腺癌-ヒト	ATCC CCL-2
PC-3	接着	前立腺癌-ヒト	ATCC CRL-1435

測定した細胞株は、一般的な施設で使用されている細胞株です。その中には接着細胞、浮遊細胞、哺乳類細胞株、昆虫細胞株が含まれます。

図5. Guava Muse セルアナライザーによる各細胞株における細胞濃度の希釈直線性の確認

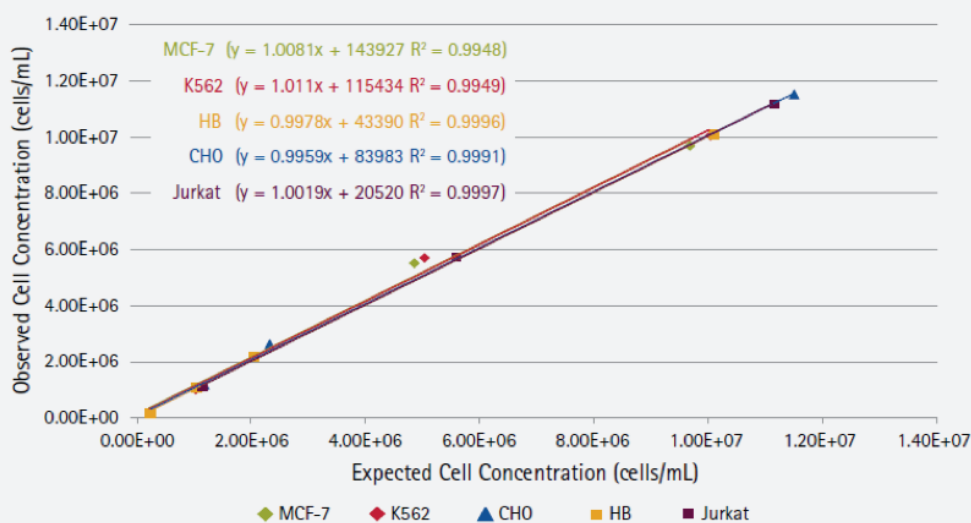


図5. 接着細胞と浮遊細胞の代表的な細胞株を段階希釈して測定した細胞濃度の結果です。各結果は3回測定を行なった結果の平均値を表します。

Guava Muse セルアナライザーと他法を比較した場合の計数結果

細胞計数と生存率の測定について、Muse Count & Viability Kitと他製品の精度を比較しました。表2は、3種類の方法で測定した細胞濃度と生存率の結果です。

表2. 細胞計数と生存率測定におけるGuava Muse セルアナライザーと他のデバイスとの比較

	Guava Muse セルアナライザー	血球計算盤	画像ベース自動 セルカウンター
測定フォーマット	チューブベース	スライドベース	スライドベース
染色方法	蛍光色素	トリパンブルー	トリパンブルー
手技差の影響	最小	非常に大きい	なし
細胞測定数の設定	サンプル間で一定	濃度に依存 (サンプル間で異なる)	不明(濃度に依存)
測定細胞数	多数の細胞 (統計的優位性あり)	わずかな細胞数	わずかな細胞数
細胞取得のスピード	1~2分	手動カウントのために遅い	1分以内
染色済サンプルの 保存可能時間	比較的柔軟	染色後すぐに分析する 必要がある	染色後すぐに分析する 必要がある
データの抽出様式	再解析や分析を実施しやすい Excel®ファイルのエクスポート	手書きのため紛失リスクあり	計数のみcsvファイルに エクスポート可能

濃度と生存率が異なる5種類の細胞株を用いてGuava Muse セルアナライザー (Muse Count & Viability Kit)、血球計算盤、画像ベース自動セルカウンターの3種類の 방법으로細胞濃度を測定し、結果を比較しました。図6は、サンプルを上記の各手法で計3回ずつ測定後、平均細胞濃度をY軸にプロットし、X軸の値については、上記の3つの手法で測定した全結果から平均細胞濃度を算出してプロットしました。(測定ポイントごとに各方法で3回測定後、測定ポイントの全測定結果から平均細胞濃度を算出しています)。

Guava Muse セルアナライザーを用いて得られた回帰直線は、血球計算盤や画像ベース自動セルカウンターの結果とよく一致しており、正確かつ比較可能なデータであることを示しています。

図6. Guava Muse セルアナライザーと他の分析方法による浮遊細胞 (A) と接着細胞 (B) の細胞濃度測定の結果

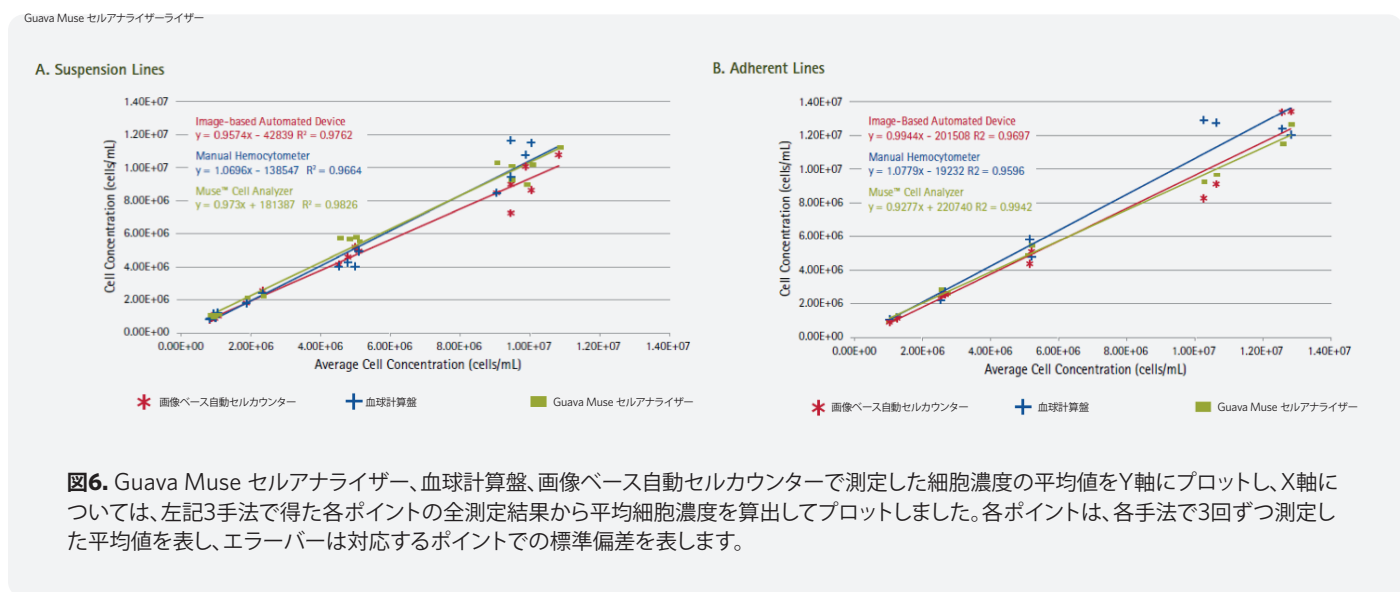


図6. Guava Muse セルアナライザー、血球計算盤、画像ベース自動セルカウンターで測定した細胞濃度の平均値をY軸にプロットし、X軸については、左記3手法で得た各ポイントの全測定結果から平均細胞濃度を算出してプロットしました。各ポイントは、各手法で3回ずつ測定した平均値を表し、エラーバーは対応するポイントでの標準偏差を表します。

精度と再現性

上記の分析方法と解析(図5および図6)を通じて評価したMuse Count & Viability アッセイキットの精度をまとめます。表3は、平均変動係数(%CV)をまとめたものです。%CVの範囲は、複数の濃度で調製した浮遊細胞および接着細胞の計90サンプルを用いて得られた結果であり、各サンプルにおいて計3回の測定結果から算出されています。

表3は、Guava Muse セルアナライザーによる細胞濃度の測定において、標準偏差が平均4.0%CVであることを示しています。これは、画像ベース自動セルカウンターで観察された結果(9.2%)や血球計算盤で観察された結果(6.3%)よりも低い値です。また、画像ベース自動セルカウンターと血球計算盤の各%CV範囲は値が大きかったのに対し、Guava Muse セルアナライザーの%CV範囲は最小であり、測定サンプルの範囲全体でも10%未満の%CV範囲になりました。トリパンプルベースの測定の場合、低い細胞濃度の試料は%CV範囲が高くなりました。

加えて、表3は、Guava Muse セルアナライザーで測定した生存率の平均%CV(2.2%)が他の方法に比べて低いことを示しています。生存率の%CV範囲についても、Guava Muse セルアナライザーは<7%となり、他の方法に比べて優れていることがわかりました。このデータは、異なる濃度で調製された複数の各細胞株において、Guava Muse セルアナライザーの計数が優れた精度であることを示しています。

表3. Guava Muse セルアナライザーはトリパンプルの分析と比較して細胞濃度および生存率測定について優れた精度を示しています。

分析方法	細胞濃度		生存率	
	平均 %CV	%CV 範囲	平均 %CV	%CV 範囲
Guava Muse セルアナライザー	4.0%	0.3-8.8%	2.2%	0.4-5.6%
画像ベースの自動セルカウンター	9.2%	1.2-23.3%	3.7%	0.8-12.1%
血球計算盤	6.3%	0.-15.3%	4.5%	0.5-9.2%

上記データは、異なる濃度と生存率を有する複数の接着細胞または浮遊細胞を用いて、30サンプルの測定を各3回実施して解析した結果です。

図7は、各表示濃度における各細胞株の生存率の結果を示しています。標準偏差のバーが示すように各濃度で細胞生存率の変動は小さいことがわかります。このデータは、Guava Muse セルアナライザーが幅広い濃度範囲で信頼性の高い測定結果を提供し、標準的な培養細胞で用いる細胞濃度に適用可能であることを支持しています。

図7. さまざまな細胞濃度および細胞種の生存率の測定結果

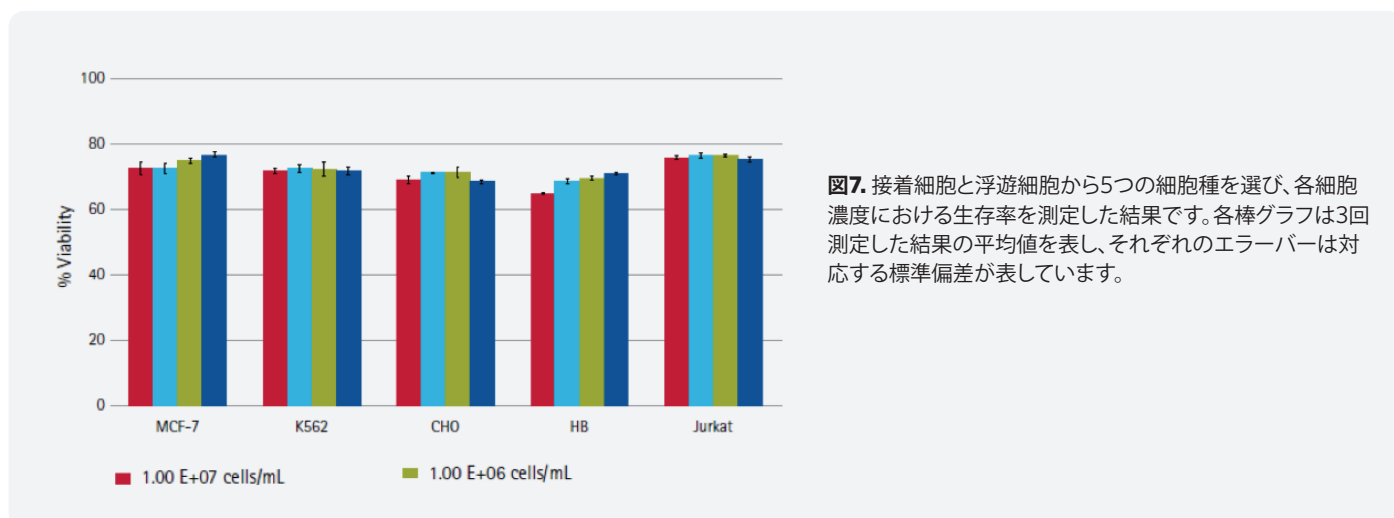


図7. 接着細胞と浮遊細胞から5つの細胞種を選び、各細胞濃度における生存率を測定した結果です。各棒グラフは3回測定した結果の平均値を表し、それぞれのエラーバーは対応する標準偏差が表しています。

まとめ

Guava® Muse™ セルアナライザーは単一のプラットフォームで細胞のセルヘルスに関連する複数のパラメータを測定できる堅牢なアナライザーです。そのアッセイモジュールは、細胞の計数や生存率、アポトーシス検出や細胞周期を測定する専用キットを用いて迅速で簡単な細胞解析を実現します。

Guava Museセルアナライザーによる測定結果は、従来の一般的な分析方法で得られる結果と相関し、さまざまな細胞種の濃度に対して正確な測定結果をもたらすことが確認されています。Guava Muse セルアナライザーによって、セルヘルス測定をシンプルかつ手頃な価格で簡単に実現できるため、細胞解析を日常の細胞培養ワークフローに組み込むことが可能になります。その結果、細胞ベースの実験から得られたデータの一貫性と再現性が向上し、より迅速で正確な意思決定と生産的な研究が可能になります。

Guava Muse セルアナライザーについての詳細は、Luminexのウェブサイトでご確認ください。

<https://www.luminexcorp.com/ja/muse-cell-analyzer/>

Luminex
complexity simplified.

ルミネックス・ジャパン株式会社

〒106-0041 東京都港区麻布台 1-7-2 神谷町麻布台ビル
www.luminexcorp.com/ja

テクニカルサポートお問い合わせ窓口
Tel: 03.5545.7444 (受付時間 9:00 ~ 18:00)
Email: supportjapan@luminexcorp.com

©2020 Luminex Corporation. All rights reserved.
Guava, Museは、米国および他の国々で登録されたルミネックス・コーポレーションの商標または登録商標です。Coulter Counterは、ベックマン・コールター社の登録商標です。Tritonは、ダウ・ケミカル・カンパニーまたは、その関連会社の商標です。BODIPYは、Molecular Probes, Inc.の登録商標です。
本製品は研究用機器です。体外診断用には使用できません。研究用試薬と併せてお使いください。諸般の理由により、予告なく仕様を変更する場合がございますのであらかじめご了承ください。

FL213046_AP-R-JP