



技術ノート 191

細胞カウントの精度向上させる7つのポイント

はじめに

細胞カウントと細胞生存率測定は、多種多様なサンプルを用いた幅広い研究用途に不可欠です。治療・医学研究における細胞カウントプロセスには、赤血球数、白血球の生存率測定、樹状細胞のモニタリングなどの血液測定が含まれます。血球計算盤を用いてカウントすることは可能ですが、手動カウントは不正確で時間がかかるため、大きな制約となる可能性があります。自動セルカウンターを使用することで最良の結果が得られますが、正確で再現性のある結果を確保するためには、考慮すべきベストプラクティスが存在します。これは、手動で細胞をカウントする場合でも、CellDropセルカウンターなどの自動システムを使用する場合にも当てはまります。

1. サンプル表面のクリーニング

あらゆる細胞カウント方法において、チャンバー表面は清潔でなければなりません。ゴミや汚れなどがあると、不正確な結果を招く可能性があります。手動での細胞カウントでは、カバーガラスを取り外して洗浄し、チャンバーを70%エタノールで洗浄した後、水で洗浄します。使い捨てプラスチックスライドを使用する場合、サンプル（スライドに2つのチャンバーがある場合はサンプルペア）ごとに新しいスライドが必要です。

CellDropシリーズでは、チャンバーは互いに平行な2枚のサファイア表面の間に形成されます。サンプルは表面間に投入され、表面張力によって保持されます。チャンバー表面のクリーニングには、乾いた実験室用ワイプで拭くだけで十分です（図1）。追加洗浄が必要な場合は、15 μ Lの70%エタノールまたは10%漂白剤でチャンバーをクリーニングしてください。溶液注入後、約10秒間放置してから乾いた実験室用ワイプで表面を拭き取ります。



図 1: 乾いた実験用ワイプで、チャンバーの上面と下面をきれいに拭いてください。

2. サンプルロード直前にピベッティングすること

サンプルをロードする直前にピベッティングすることは、測定データの正確性を保つために不可欠です。異なるサイズや種類の細胞は、沈降・凝集速度が異なります。

ロード直前に溶液をピベッティングすることで、サンプルが均一となり、培養細胞の状態を正確に反映する可能性が高まります。

3. 細胞凝集を最小限に抑える

細胞カウントにはストック溶液全体の少量サンプルを解析する必要があるため、サンプルが元のストック溶液の代表性を確実にするために注意が必要です。CellDropなどのセルカウンターは、細胞塊内の細胞を識別するアルゴリズムを適用しますが、代表性のないサンプルを補正することはできません。手動カウントの場合、細胞塊は分散された細胞よりも主観的に評価されるため、操作者間のばらつきが増大する可能性があります。

細胞溶解後の細胞外DNAおよび細胞残渣は、凝集の一般的な原因です。細胞溶解は過剰増殖、過剰なピベッティングによるせん断、凍結融解サイクルによって生じ、トリプシンによる消化不足または過剰消化も不均一なサンプルにつながる可能性があります。細胞溶解の原因を回避し、サンプルから細胞残渣を除去することで、細胞凝集体を減らすことができます。

4. 設定の最適化

手動およびソフトウェアアルゴリズムによるカウントでも、フォーカスを合わせ、露光設定を調整し、細胞を可能な限り明確に可視化することが、最も正確な結果を得るために重要です。最適なフォーカス（図2）と露光（図3）設定により、細胞膜と背景の鮮明なコントラストが得られます。蛍光アプリケーションにおいて各蛍光チャネルを個別に最適化することで、最も再現性の高い結果をもたらします。蛍光強度は、細胞が実際のサイズを維持したまま可能な限り明るく見えるように調節し、細胞の縁から光が漏れないように設定してください。詳細につきましては、[CellDrop クイックガイド](#)をご参照ください。

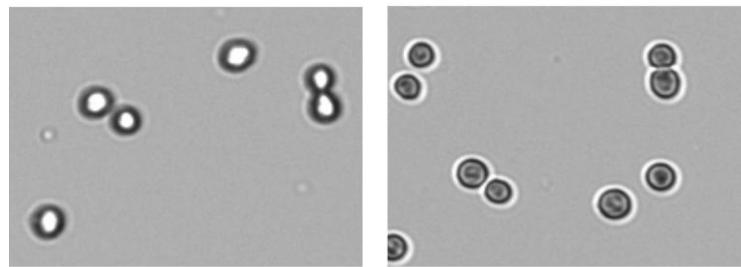


図2：最適な焦点。正しい焦点（左）と焦点の合っていない画像（右）。

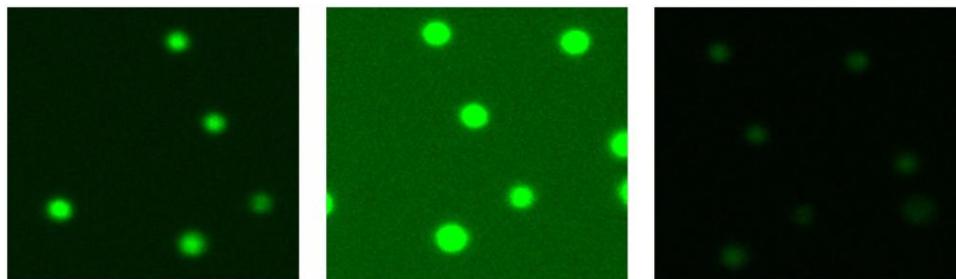


図3：露出。適正露光（左）、露光過剰（中央）、露光不足（右）。

5. 適切なチャンバー高さの選択

血球計算盤には深さやグリッド設計が異なる様々な種類があります。計算には正確な情報を使用し、誤差が生じないよう注意が必要です。CellDropは、他のスライド式カウンターよりも幅広い細胞密度に対応できる独自の機能を備えています。ローディングチャンバーの高さはソフトウェアで調整可能であり、最も広い細胞密度とサイズ範囲に対応します。最適な高さを確保するため、画面上にガイダンスが表示され、計算は自動的に調整されます。

6. カウントパラメーターの調整

ほとんどのオートセルカウンターには、対象細胞を最適に測定するためのパラメーター設定が含まれています。例えば、細胞サイズ範囲を設定・保存することで、デブリや他の細胞集団を解析から除外できます。細胞形状を定義する設定も利用可能です。CellDropの場合、細胞カウント前またはカウント後に設定を調整でき、新しいパラメーターに基づいてデータが再解析されます。

7. 明視野または蛍光モードの選択

明視野測定は培養哺乳類細胞のカウントに有効です。しかし、トリパンブルーを用いた生細胞と死細胞の識別は困難であり、多くの初代培養細胞では蛍光標識が必要となります。例えば末梢血単核細胞（PBMCs）は通常、大量の赤血球（RBCs）が混在しており、明視野測定では、これらが「死細胞」として検出される可能性があります。

しかし、アクリジンオレンジ（AO）やプロピシウムヨウ化物（PI）などの染色剤を用いれば、有核PBMCsのみを選択的に染色し、二重蛍光機能によって生細胞と死細胞を区別することができます。AOとPIはいずれも核酸を染色しますが、生細胞膜を透過できるのはAOのみです。その結果、生きたPBMCはAOで染色され緑色に蛍光を発し、死んだPBMCはAOとPIの両方で染色され赤色に蛍光を発します。赤血球は染色されず、全く蛍光を発しません。

まとめ

これらのポイントを活用いただくことで、細胞カウントの精度と再現性が向上します。詳細については、ウェビナーをご視聴もしくは株式会社スクラム 八幡までお問い合わせください。連絡先 mail: m-yahata@scrum-net.co.jp

ウェビナー：細胞カウントの精度を向上させる7つのポイント



<https://youtu.be/cQXk1txP4po>