



## CL-Quantアドオンモジュール

# 「間葉系幹細胞カウント」を用いた 間葉系幹細胞の計測

### < BioStudio-T 使用例 >

血清のロットチェックや培養条件の検討、薬剤添加の効果など細胞増殖を経時的に評価するには、マルチウェルに播種した細胞の「剥離」「カウント」「増殖カーブの生成と確認」を数日間にわたって毎日同じ時間に行う必要があります。多くの時間と手間を要します。また、細胞や血清・培地など貴重な資源を大量に消費します。さらに、「剥離」「カウント」などの操作は作業間で差が生じやすく、均一な播種には熟練した技術を必要とすること、懸濁液の細胞数を計測して調整しても実際に播種した細胞数と計算上との誤差が不可避であることなどにより、精度の確保が困難です。

画像解析ソフトウェア CL-Quantとアドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」を組み合わせることで、培養中のMSC細胞の位相差画像から細胞数の計測が行えます。

インキュベーター内に設置したBioStudio-TにMSCを播種したプレートを置き、数日間にわたって経時的に取得した位相差画像から、アドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」を用いて細胞数カウントを行いました。

#### 観察装置

- BioStudio-T (Nikon, BS-T04A)

#### 画像解析ソフトウェア

- CL-Quant ver. 5.02 (Nikon, MLS21000)

#### CL-Quant アドオンモジュール

- 間葉系幹細胞カウントPC-CO04 (Nikon, MLS30104)

#### 細胞

- 骨髄由来間葉系幹細胞hTERT, HPV E7導入 不死化細胞株UE7T-13 (JCRB1154, JCRB細胞バンク)

#### 試薬及び材料

- Gibco™ DMEM, low glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, 11885084; With Low Glucose, L-Glutamine, Sodium Pyruvate, without HEPES)
- Gibco™ Fetal Bovine Serum, mesenchymal stem cell-qualified, USDA-approved regions (Thermo Fisher Scientific, 12662029)
- Gibco™ PBS(-), pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)
- TrypLE™ Select (1x), no Phenol Red (Thermo Fisher Scientific, 12563011)
- StemSure® 0.1w/v%ゼラチン溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 190-15805)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

#### 方法

UE7T-13細胞を6ウェルプレートの各ウェルに、 $1.0 \times 10^4$ 、 $2.0 \times 10^4$ 、 $4.0 \times 10^4$ 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。CO<sub>2</sub>インキュベーターに4倍モデルBioStudio-Tを設置し、37°C、加湿した5% CO<sub>2</sub>環境下で培養しました。播種4時間後から6時間毎に、ウェル中心部の12x9視野の位相差画像を撮影しました。撮影条件は、各ウェル中心部においてマニュアルで調整したZ位置をグリッドメニューにデータセットし、image AF設定をonにしてタイムラプス撮影を行いました。撮影した画像をCL-Quantに取り込み、メニスカスのない領域10x7視野の画像を切り取りアドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」を用いて解析し、細胞数を測定しました。得られた測定値をグラフ化し、細胞増殖を確認しました。

## 結果

6日間培養し撮影した位相差画像のメニスカスのない領域10x7視野を切り取り、アドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」にて解析しました。その画像の一部を図1に示しました。各細胞を認識していることが確認できます。CL-Quantにより自動計測された細胞数から増殖カーブを作成しました(図2)。

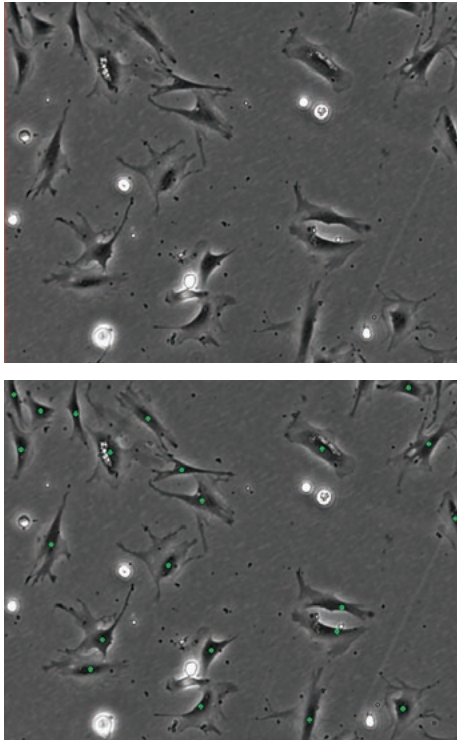


図1 UE7T-13細胞の位相差画像とマスク画像

(上)UE7T-13細胞を $4.0 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で播種し、播種4時間後の位相差画像の一部。(下) 上記画像にCL-Quantのアドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」をアプライした画像

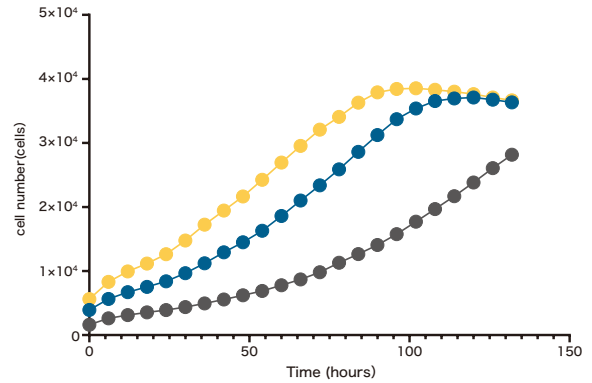


図2 UE7T-13細胞の増殖カーブ

UE7T-13細胞を $1.0 \times 10^4$  (黒)、 $2.0 \times 10^4$  (青)、 $4.0 \times 10^4$  (黄) 細胞数/ウェルの密度で播種し、メニスカスの影響のない10x7視野の画像にアドオンモジュール「間葉系幹細胞カウント」をアプライし、細胞数を数値化した。なお、10x7視野は $3.575126 \text{cm}^2$ となる。

## まとめ

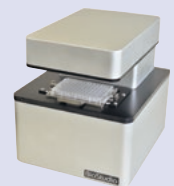
- UE7T-13細胞の培養過程の位相差画像をCL-Quantで解析することにより、細胞を剥離・分散することなく、細胞数の算出が可能であることが示されました。
- 細胞増殖評価を行った細胞を無駄にすることなく、次の実験に使用することが可能です。
- 培養しながら細胞数の確認が可能のため、解析結果から継代のタイミングを決定したり、細胞を適切なタイミングで実験に使用したりすることが可能です。

## <観察装置のご紹介>

インキュベータに内蔵した顕微鏡で細胞を長期モニタリングできるBioStation CTと、ステージを動かさずに観察可能なBioStudio-T。いずれも細胞に与えるストレスを抑え、試料内の複数の地点において経時変化をタイムラプス撮影できます。ニコンのライブセルイメージング機器と独自の画像解析技術を用いることにより、細胞の特性をリアルタイムで、経時的に観察・解析することが可能です。



BioStation CT



BioStudio-T



株式会社 ニコン  
108-6290 東京都港区港南2-15-3 (品川インターシティ C棟)  
<https://www.nikon.co.jp/>

お問い合わせ先

株式会社 ニコン インステック

バイオサイエンス営業本部  
140-0015 東京都品川区西大井1-6-3(株式会社ニコン 大井ウエストビル3F)  
Tel: (03)773-8138  
[https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja\\_JP/](https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/)