

iSpect DIA-10によるスフェロイド（細胞塊）の計数・形状評価

前田 裕貴、岡田 光加

ユーザーベネフィット

- ◆ 短時間で試料液中のほぼ全粒子の検出が可能です。（100 μLの試料液の場合、数分程度）
- ◆ 標準試料不要のオートフォーカス機能により、15秒程度でフォーカス合わせが完了します。
- ◆ 形状パラメータによるフィルタリングにより、シングルセル混在下でもスフェロイドのみの計数が可能です。

■はじめに

スフェロイド（細胞塊）は、従来の二次元培養ではなく、三次元培養により作製された細胞の凝集体です。スフェロイドなどの細胞塊は、二次元培養により作製される接着細胞と比較して、生体に近い生理機能を発揮しやすいため、細胞治療や薬剤感受性試験への活用が期待されています。スフェロイドの培養条件検討、品質管理、あるいは研究への応用において、その濃度・サイズの把握は重要です。

ダイナミック粒子画像解析システム iSpect DIA-10（図1）は、動的画像解析法に基づき、液体試料中の粒子画像を取得し、粒子径分布・粒子濃度・形状測定を行う装置です。見逃しが少ない光学系（撮影効率90%以上）により、数分で数万個の粒子を解析し、フィルタリング条件を設定することでスフェロイドの抽出と計数が可能です。

本稿では、iSpect DIA-10を用いてHEK293細胞のシングルセルとスフェロイドの懸濁液を評価した事例を紹介します。



図1 ダイナミック粒子画像解析システム iSpect™ DIA-10

■試料と方法

試料にはDMEM培地中にHEK293細胞のシングルセルとスフェロイドが懸濁した液を用いました。測定条件を表1に示します。100 μm以上の細胞塊を評価するために、流路の厚みが300 μmのマイクロセル（特注対応）を使用して測定しました。

表1 測定条件

装置	: iSpect DIA-10
セル	: 300 μmセル*
フレームレート [fps]	: 6
撮影効率 [%]	: 90.5
分析総量 [μL]	: 50
分析流量 [mL/min]	: 0.2
輝度値	: 240
二値化処理閾値	: 220

*特注対応。100 μm以上の粒子を評価する場合に使用します。ただし、20 μm未満の粒子の検出性能が低下します。

■測定結果

測定時のセルの様子を図2に示します。スフェロイド、シングルセル、夾雑物などと考えられる粒子が確認できます。

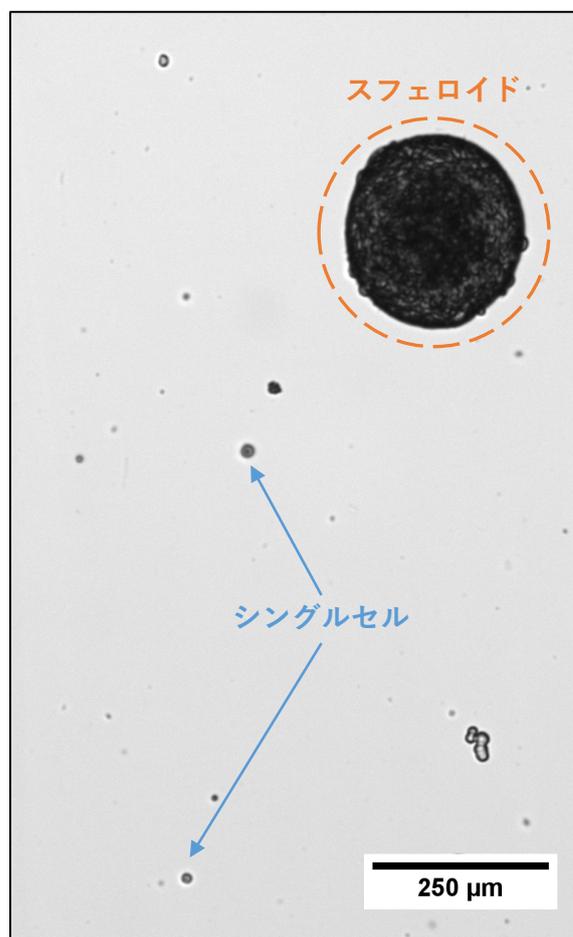


図2 測定時のセル画像例
測定時に90枚撮影した内の1枚を表示しています。

図3、図4に散布図と粒子径分布を示します。散布図より、約5 ~ 50 μmに分布している粒子群1（青色の枠内）と約80 ~ 400 μmに分布している粒子群2（オレンジ色の枠内）の2グループが確認できます。また粒子径分布から、約5 ~ 50 μmの粒子群の個数が非常に多いことが分かります。

図5に粒子画像の一部を示します。左上から大きい順に並んでおり、約40 ~ 220 μmの粒子を表示しています。粒子画像から、86.907 μmの粒子と55.303 μmの粒子を境界として、それより大きい粒子がスフェロイド、それより小さい

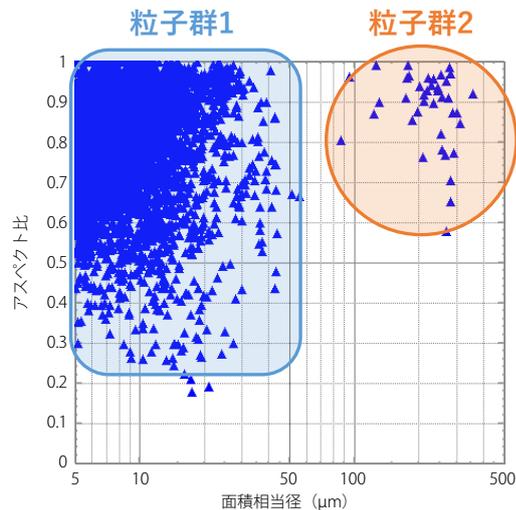


図3 散布図
X軸：面積相当径 Y軸：アスペクト比*
*[アスペクト比]=[最大長垂直長]÷[最大長]

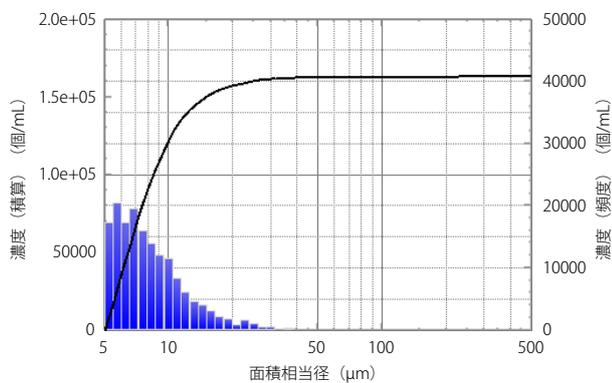


図4 粒子径分布

粒子がシングルセル、シングルセルの連なった粒子、もしくは夾雑物であると考えられます。そこで、60 μm以上の粒子はほぼスフェロイドであるのみなし、粒子径区間ごと粒子濃度を求めたのが表2です。このように、粒子画像と形状パラメータを用いたフィルタリングにより、スフェロイドと考えられる粒子のみを抽出し、その個数濃度を求めることができました。

表2 粒子濃度

	粒子濃度 [個/mL]
粒子群1 (60 μm未満の粒子、シングルセル・夾雑物)	163055
粒子群2 (60 μm以上の粒子、スフェロイド)	862

■まとめ

iSpect DIA-10を用い、HEK293細胞のシングルセルとスフェロイドの混在した懸濁液を測定しました。散布図・粒子径分布・粒子画像から、スフェロイドと考えられる領域を判断し、フィルタリングを行うことで、スフェロイドのみの個数濃度を得ることができました。このように、混合試料であっても、粒子径や形状パラメータを用いてフィルタリングを行うことで、目的の粒子のみの計数が可能です。またiSpect DIA-10は数分で数万個程度の粒子の検出が可能で、サンプル使用量も少ないため、スフェロイドの計数の効率化に有効です。

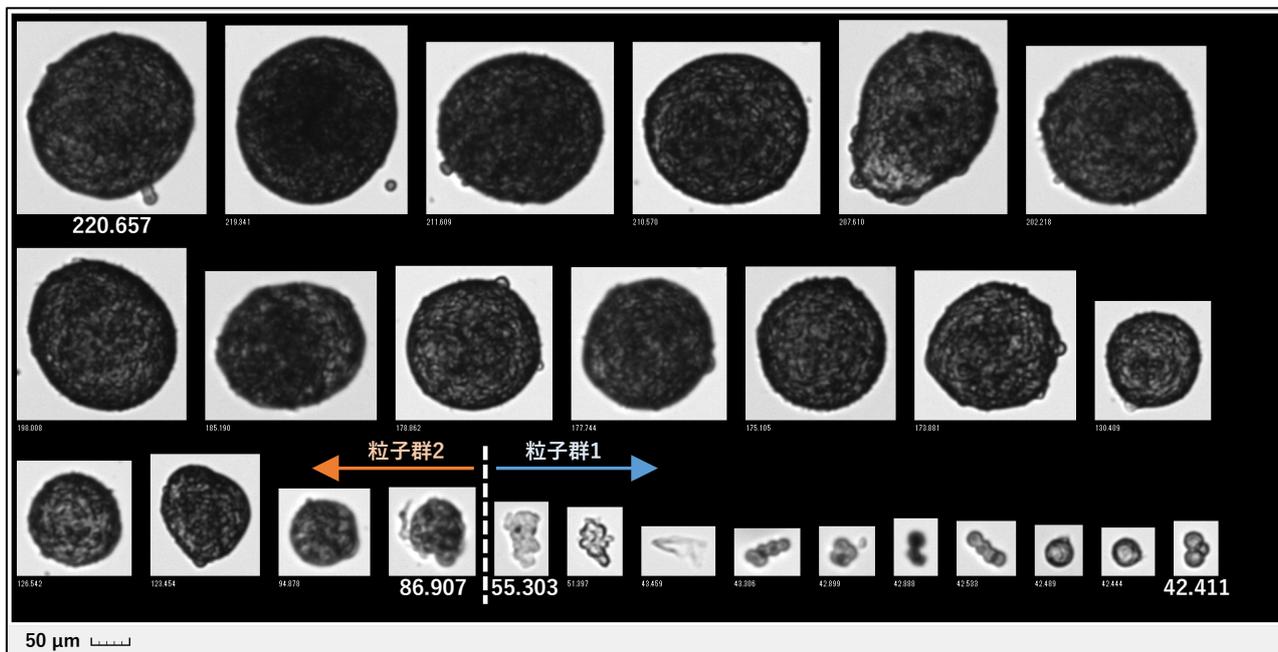


図5 粒子画像

左上から面積相当径が大きい順に並んでおり、40～220 μm程度の粒子を表示しています。各粒子画像の下の数値は面積相当径 (μm) です。

iSpectは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

01-00430-JP 初版発行：2022年12月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ iSpect DIA-10
ダイナミック粒子画像解析システム

関連分野

▶ 臨床研究・法科学

▶ 臨床研究

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ