

ラベルフリーライブセルイメージングを活用した、細胞増殖アッセイとHCAのアッセイ最適化

細胞数の計測は、細胞増殖、細胞増殖阻害、細胞毒性、細胞死メカニズムなどの研究をはじめ、幅広い分野で利用されています。細胞数を計測することで薬剤や成分が細胞に与える影響を分析できます。細胞増殖サプリメントとして一般的に使用されているウシ胎児血清 (FBS) には、細胞増殖を促進する成長因子が含まれています。しかし、FBSはロット間で成分の変動が大きく、再現性のある研究結果を得るためにロット評価を実施して最適なロットを選択することが必要です。ロット間のバラツキがアッセイの失敗や再現性の危機につながる可能性があります。

また、細胞密度の違いも細胞増殖やアッセイの結果に大きく影響し、再現性低下の原因となります。

細胞画像を数値化して定量評価するハイコンテンツアナリシス (HCA) では、アッセイの目的に応じた最適な細胞播種数や薬剤処理時間などのアッセイ条件を検討し、最適化する必要があります。本アプリケーションノートでは、焦点面の異なる明視野画像から細胞構造を反映した位相分布画像 (Volume Contrast画像) を生成し、この「VC画像」を活用して生細胞を染色することなく細胞数を経時的に計測することにより、HCAのアッセイ最適化を実施したラベルフリー細胞増殖アッセイを紹介します。

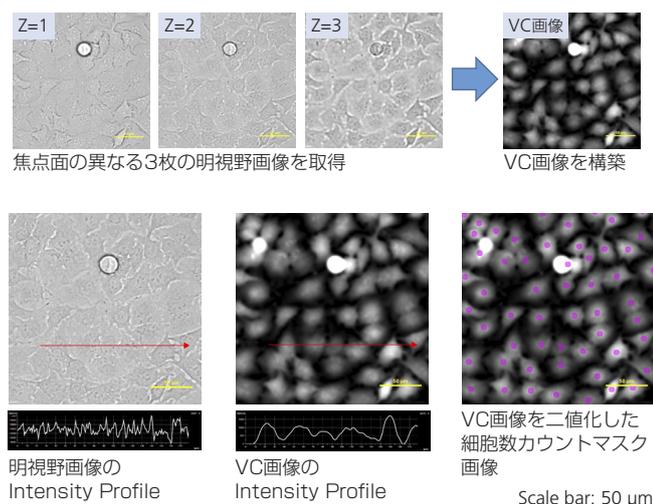
ライブセル細胞増殖アッセイの課題

短期間のライブセルアッセイでは、Hoechstなどの核染色試薬が利用されています。しかし、生細胞への色素の毒性や蛍光励起による光毒性により、長期間のライブセルアッセイでは細胞増殖が抑制されます。(1)

また、HCAのアッセイでは、ウェル径の小さな96ウェルプレートなどのマルチウェルプレートが用いられますが、メニスカス効果により位相差観察が困難です。透過光を用いた明視野観察はメニスカス効果を低減できますが、コントラストが低いため、細胞の観察や細胞数カウントを行うための二値化が困難です。

明視野画像からVC画像を構築し、容易に二値化やセグメンテーションが可能

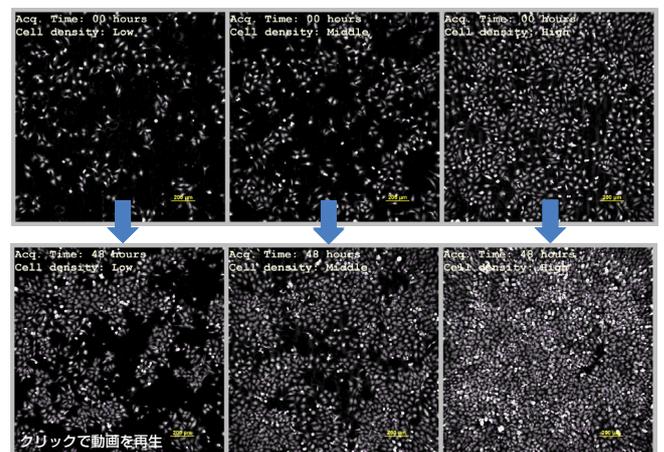
明視野画像はSNRが低く、細胞領域の二値化が困難です。一方、VC画像は、細胞の厚みがある領域の画素値が大きく出力される



ため、背景と細胞領域の区別が容易であり、細胞密集領域でもセグメンテーションが簡単で、細胞数カウントの精度を向上できます。

広視野により細胞数のバラツキの影響を低減

同じ細胞播種数で細胞を播種してもウェル内の場所によって細胞数にバラツキがあります。広視野で撮影することで視野内の細胞数が多くなり、再現性のある研究結果が得られます。また、ウェル間で細胞播種数が異なる視野でも、最初のフレーム (T=0) の細胞数で各タイムポイントの細胞数を除いてノーマライズすることにより、ウェル間を比較できます。



作例動画

 細胞播種密度、左：低、中央：中、右：高
 上段：撮影開始0h、下段：撮影開始後48h

Scale bar: 200 μm

細胞増殖アッセイ

細胞・試薬・材料

- ・ヒト子宮頸癌由来細胞株HeLa (Riken Cell Bank, RCB0007)
- ・Minimum Essential Medium Eagle With Earle's salts (Sigma-Aldrich, M4655)
- ・FluoroBrite™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, A1896701)
- ・Fetal Bovine Serum, qualified, USDA-approved regions (Thermo Fisher Scientific, 10437028)
- ・L-Glutamine (200 mM) (Thermo Fisher Scientific, 25030081)
- ・Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Thermo Fisher Scientific, 15140122)
- ・Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermo Fisher Scientific, 25200072)
- ・DPBS, no calcium, no magnesium (Thermo Fisher Scientific, 14190144)
- ・EZVIEW® Culture Plate LB (AGCTECHNO GLASS, 5866-096)
- ・CELL CULTURE MICROPLATE, 96 WELL (Greiner, 655090)

観察装置・ソフトウェア

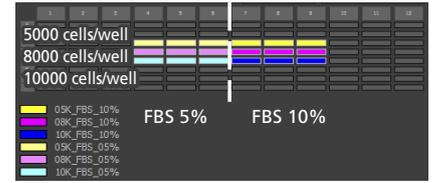
- ・顕微鏡：Ti2-E (Nikon)
- ・対物レンズ：CFI Plan Apo Lambda S 10X NA 0.45
- ・モノクロカメラ：DS-Qi2
- ・画像解析ソフトウェア：NIS-Elements (Nikon)
- ・ステージトップインキュベーター：STX series (TOKAI HIT)

結果

方法

HeLa細胞をガラスボトム96ウェルプレートに5,000 cells/well, 8,000 cells/well, 10,000 cells/wellの3種類の細胞密度で各6ウェルずつ合計18ウェル播種しました。細胞密度ごとに3ウェルずつ、5%と10%のFBSを培地に加え、約24時間培養しました。

撮影開始前に培地交換を行いました。



ステージトップインキュベーターにより37℃、5% CO₂環境を維持し、細胞播種約24時間後から3時間毎に2日間、10倍の対物レンズと25 mm FOV対応の広視野モノクロカメラを用いて、ウェル中心部の1視野(約1.76 mm x 1.76 mm)の明視野Zスタック画像を3枚撮影しました。

次に、HeLa細胞をプラスチックボトム96ウェルプレートに5,000 cells/well、8,000 cells/well、10,000 cells/wellの3種類の細胞密度で、3ウェルずつ合計9ウェルに播種しました。培地には10%のFBSを加え、約24時間培養しました。上記と同様の設定で細胞播種約24時間後から3時間毎に2日間撮影しました。

得られた明視野画像を、NIS-Elementsの画像解析機能GA3を用いてVC画像に変換し、二値化してセルカウント解析レシピを作成しました。セルカウント解析レシピを、NIS-ElementsのBatch GA3を用いて全画像に対して実行し、計測数値をCSV形式で出力しました。CSVファイルをデータ可視化ツールMicrosoft Power BI® にインポートしてグラフを作成し、計測結果を分析しました。

■ FBS濃度比較とウェル間のノーマライズ比較

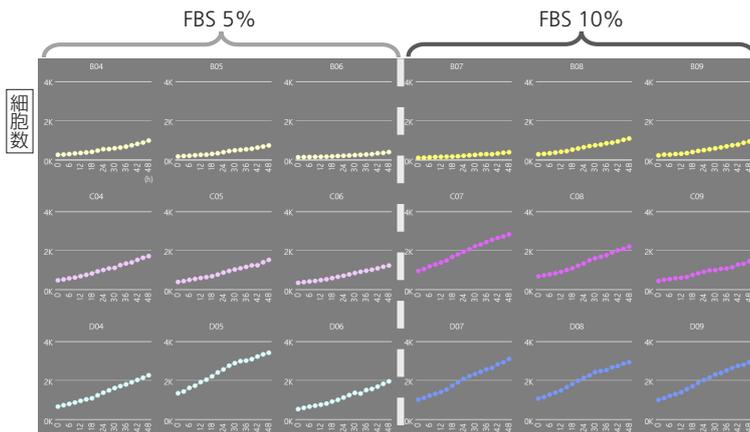


図1. 各ウェルにおける0hから48hの細胞数計測結果

左：FBS 5%、右：FBS 10%、ガラスボトムウェルプレート使用
細胞播種数：(上段) 5,000 cells/well
(中段) 8,000 cells/well
(下段) 10,000 cells/well

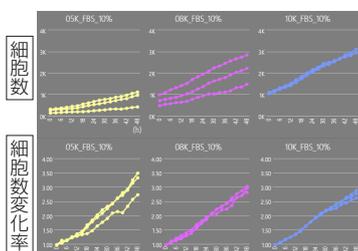


図3. 細胞数の推移と変化率

FBS 10%で培養、ガラスボトムウェルプレート使用
上段：細胞数計測結果
下段：最初のフレーム(T=0)からの細胞数変化率

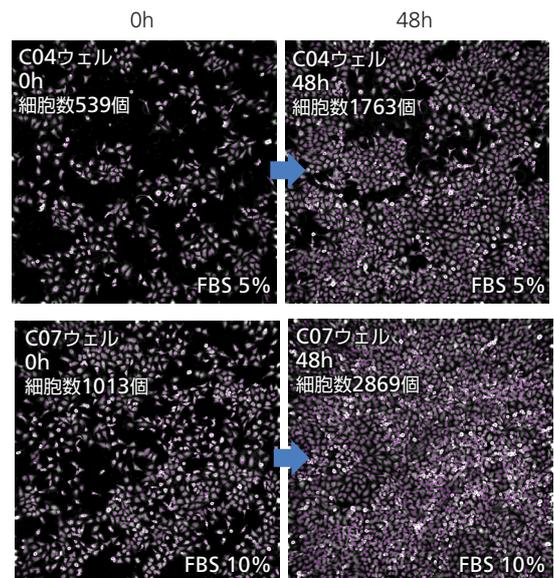


図2. FBS濃度ごとのセルカウントマスク画像

細胞播種密度：中、ガラスボトムウェルプレート使用
左：撮影開始時 0h、右：撮影開始後 48h
上段：FBS 5% (C04ウェル)
下段：FBS 10% (C07ウェル)
上段：0hから48hの細胞数変化率 3.27
下段：0hから48hの細胞数変化率 2.83

結果

■細胞密度ごとの細胞数増加率の比較 (FBS 10%で培養)

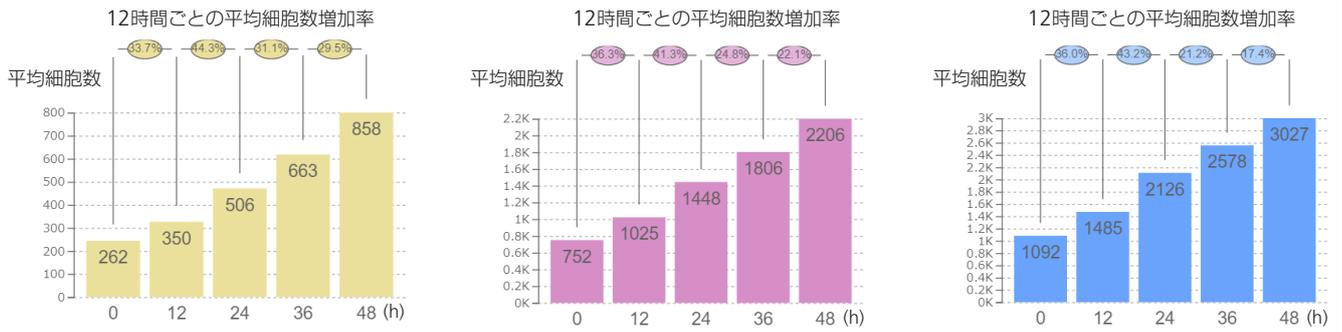


図4. 12時間ごとの平均細胞数と細胞数増加率

細胞播種数：(左) 5,000 cells/well、(中央) 8,000 cells/well、(右) 10,000 cells/well
 撮影開始36hから48hの平均細胞数増加率：(左) 29.5%、(中央) 22.1%、(右) 17.4%

■平均細胞数変化率 (FBS 10%で培養)

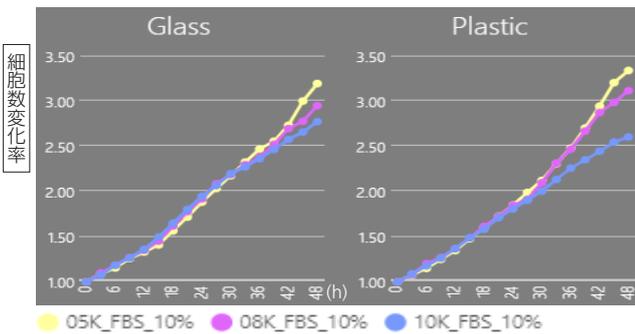


図5. 最初のフレーム (T=0) からの細胞数変化率

左：ガラスボトムウェルプレート使用
 右：プラスチックボトムウェルプレート使用

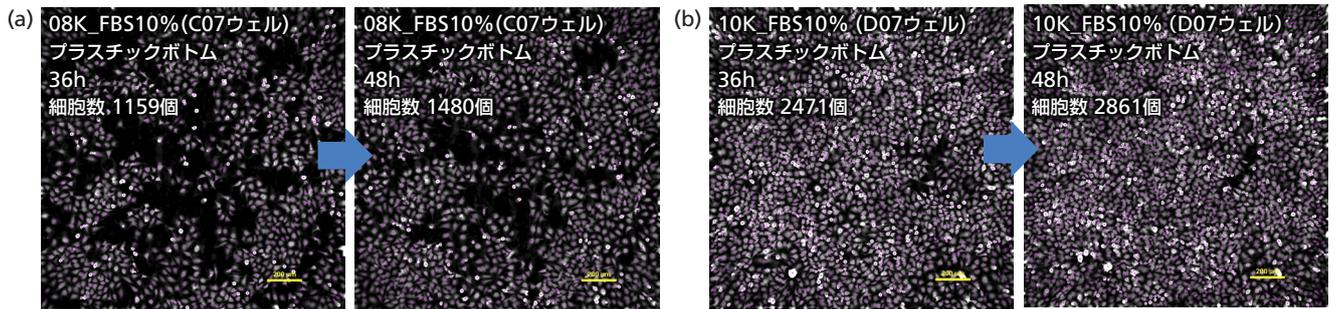


図6. 細胞播種密度が中程度のウェルと高密度のウェルのマスク画像

FBS 10%で培養、プラスチックボトムウェルプレート使用

(a) 細胞播種数：8,000 cells/well、経過時間：左：36h、右：48h、撮影開始 36hから48hの細胞数増加率：27% (C07ウェル)

(b) 細胞播種数：10,000 cells/well、経過時間：左：36h、右：48h、撮影開始 36hから48hの細胞数増加率：15% (D07ウェル)

Scale bar: 200 μm

- ・明視野画像からVC画像を構築することにより、細胞密集領域でもラベルフリーで細胞数を計測できました。(図1, 図2)。
- ・ウェル間で細胞数が異なる視野でも、最初のフレーム(T=0)の細胞数で各タイムポイントの細胞数を除してノーマライズすることにより、ウェル間で細胞増殖を比較できました(図3)。
- ・細胞密度が高くなると、細胞数増加率が低下していました(図4)。
- ・細胞播種密度が高いウェルでは、36時間以降に細胞増殖が顕著に抑制されていました(図5~図6)。
- ・本実験条件において、36時間以上アッセイする場合は、タイムコース後半でも細胞増殖が低下しない細胞播種数8,000 cells/wellとFBS10%の条件が最適であることが確認できました(図5)。

まとめ

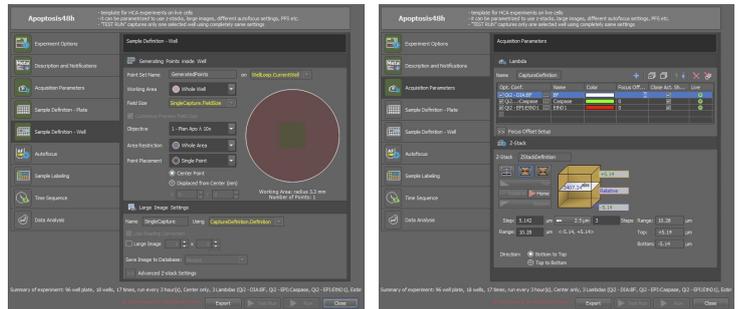
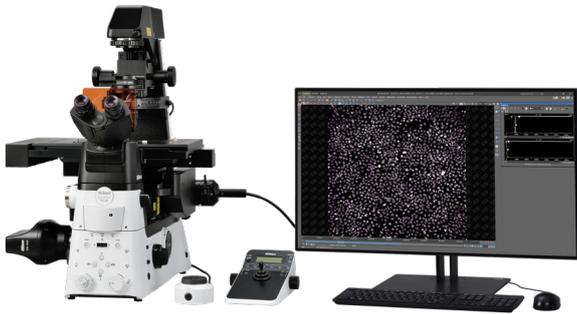
- ・NIS-Elementsソフトウェアに搭載したVolume Contrast (VC) 機能を使用することにより、蛍光染色を行うことなく、色素による毒性や光毒性の影響を受けずに解析が行えました。
- ・VC画像を用いたセルカウントは、メニスカス効果の影響を低減でき、96ウェルプレートでの長期ライブセルハイコンテンツアナリシスに有効なアッセイ系です。
- ・広視野25mm FOVによりワンショットで広範囲の細胞領域を捉え、セルカウントを行うことにより、撮影視野ごとの細胞数の偏りを抑えて再現性の高い結果を得ることができます。
- ・VC機能は、HCAのアッセイ最適化に活用できます。
- ・FBSのロットチェック、試薬の毒性チェック、FBS代替試薬や足場材など細胞培養関連製品の開発に活用できます。

引用

1. Nikon アプリケーションノート 機械学習を利用した高精度かつ非侵襲な細胞数計測 SW_app_ConSeg_j_04

ハイコンテンツアナリシス (HCA) 顕微鏡システム

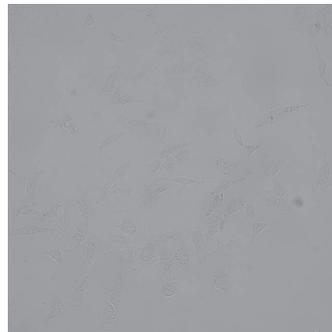
Ti2-E顕微鏡とカメラに、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのハイコンテンツアナリシス (HC) オプションを搭載。画像取得から解析まで、1つのソフトウェアで高速かつ容易に実行できます。本実験は、HCAウィザードを用いて画像取得し、Volume Contrast機能によりVC画像を生成して解析を実施しました。



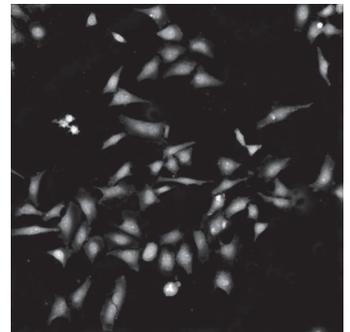
HCAウィザード

顕微鏡アドオンモジュール Volume Contrast

複数のZ深度で撮影した明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築可能な、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのアドオンモジュールです。特別な光学アクセサリーの追加は不要で、手軽にラベルフリーでの定量解析が行えます。



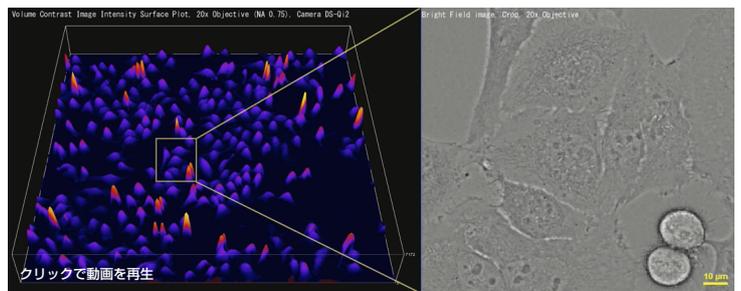
明視野画像



Volume Contrast画像

顕微鏡モノクロデジタルカメラ DS-Qi2

10倍対物レンズを用いたセルカウントのほか、20倍対物レンズを用いた細胞観察や高解像度での挙動観察においても、ワンショットで広視野25mm FOV (視野数) を撮影できるため、細胞分裂中などにおける関心領域を、タイミングを逃さずイメージングできます。



左：VC画像をIntensity Surface Profile表示した3Dタイムラプス画像
右：明視野画像をEDF画像に変換し、関心領域を拡大したタイムラプス画像

対物レンズ：20倍、Zスタック：7枚 (Z範囲：3.25 μm)



作例動画