

ハイコンテンツイメージングによる、薬物誘発性脂質症の肝毒性試験

薬物誘発性脂質症は、組織や器官に脂質が過剰に蓄積し、炎症や機能障害を引き起こす細胞毒性です。また、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓に過剰な脂肪滴が蓄積し、肝硬変・肝癌へと進行します。そのため、脂肪滴の解析は、医薬品候補物質の毒性をスクリーニングする安全性試験や、脂肪滴の蓄積を阻害する医薬品やサプリメントの開発など、幅広い分野で研究されています。本アプリケーションノートでは、脂肪滴染色蛍光色素 Lipi-Green とヒト肝がん細胞株 (HepG2細胞) を用いて、顕微鏡画像から脂肪滴の数・面積・蛍光強度を計測することにより、脂質の蓄積を解析した例を紹介します。

観察装置・ソフトウェア

- 顕微鏡：Ti2-E
 - モノクロカメラ：DS-Qi2
 - 蛍光LED照明システム：D-LEDi
 - 対物レンズ：CFI プランアポクロマート Lambda D 20X
- 画像解析ソフトウェア
 - NIS-Elements AR
 - オプションモジュール
 - NIS-A Bundle HC W/RDB
 - General Analysis 3 (GA3)
 - NIS-A EDF module

細胞・試薬・材料

- ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 (JCRB細胞バンク、JCRB1054)
- Lipi-Green (株式会社 同仁化学研究所、LDO2)
- -Cellstain[®]-Hoechst 33342 solution (株式会社 同仁化学研究所、H342)
- (±)-Propranolol hydrochloride (SIGMA-ALDRICH, P0884-1G)
- EZVIEW[®]CulturePlateLB (AGCTECHNO GLASS, 5866-096)
- Cellmatrix[®] Type I -C (新田ゼラチン株式会社)

実験の概要

- (1) コラーゲンコートした96ウェルガラスボトムプレートに HepG2細胞を 10,000 cells/well で播種し、37℃、5% CO₂インキュベーター内で24時間培養
- (2) 培地を交換後、Lipi-Green 0.5 μmol/l とプロプラノロール (0 μM, 3 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM) を各3ウェルずつに添加し、37℃、5% CO₂インキュベーター内で72時間培養
- (3) 薬物添加から72時間後に、Hoechst 33342を添加し、37℃、5% CO₂インキュベーター内で30分間インキュベート
- (4) 上清を除去し、4% PFAを添加して30分間、室温でインキュベート
- (5) 上清を除去し、PBSで2回洗浄
- (6) 顕微鏡に固定細胞のウェルプレートを設置し、Job Wizardで画像を取得
- (7) NIS-ElementsのGA3モジュールで画像解析レシピを作成し、データをCSVに出力。Microsoft Excel[®] でデータを分析

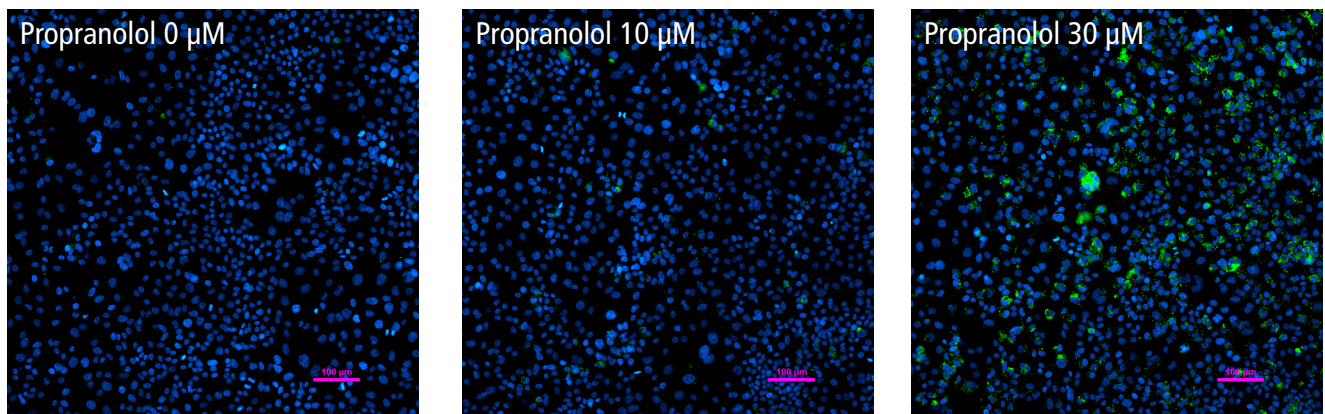
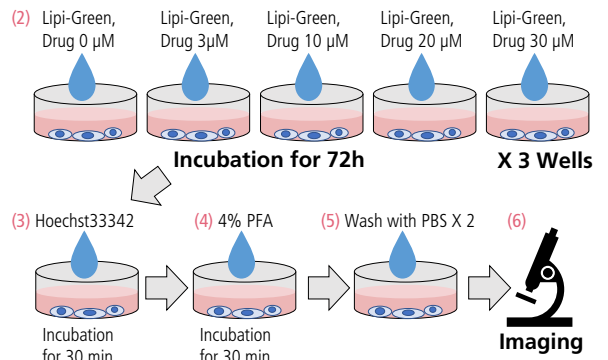


図1. 核 (青: Hoechst 33342) と脂肪滴 (緑: Lipi-Green) の蛍光染色マージ画像
プロプラノロールの濃度: 左から0 μM, 10 μM, 30 μM。プロプラノロールの用量依存的に脂肪滴が増加したことが分かる。

対物レンズ: 20倍
Scale bar: 100 μm

画像取得

20倍対物レンズと25mm FOVの広視野カメラDS-Qi2を用いて、各ウェルあたり4地点で、0.89 mm x 0.89 mmの範囲(図3. A)を1ショットで撮影(合計3.17 mm²)。さらに、明視野および蛍光2波長(青・緑)で、Z範囲6 μm(0.5 μm x 13ステップ)のZスタック画像を取得した(図2. A)。

画像解析

脂肪滴は同じ焦点面に位置していないが、EDF (Extended Depth of Focus) 画像を生成することにより、すべての脂肪滴に焦点のあった画像が取得できる(図2. B)。この画像を二値化することで、核と脂肪滴のマスキング画像が得られる(図2. C)。核マスクから細胞数を、脂肪滴マスクから細胞あたりの脂肪滴の数・面積・蛍光強度を計測した(図4)。

	明視野	Hoechst 33342 (蛍光: 青)	Lipi-Green (蛍光: 緑)
光源	Diascopic LED	D-LED1 (Power: 30%)	D-LED1 (Power: 35%)
Ex/Em(nm)	—	385/460 nm	475/535 nm
Exposure	2 ms	30 ms	30 ms

表1. 画像取得の条件

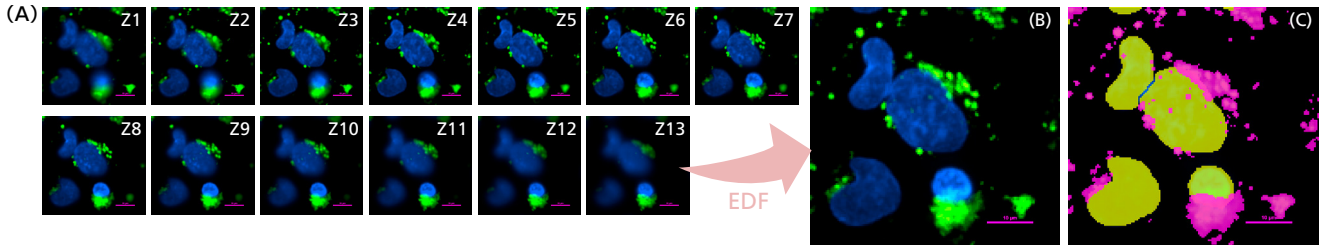


図2. 蛍光Zスタック画像からEDF画像を構築

- (A) Zスタック画像: 0.5 μm x 13枚 (Z範囲: 6 μm)、青: 核、緑: 脂肪滴 (中性脂肪)
 (B) NIS-ElementsソフトウェアのEDFモジュールにより、Zスタック画像から1枚のEDF画像を生成
 (C) GA3モジュールを使用してEDF画像を二値化し、マスク画像を取得、黄: 核マスク、ピンク: 脂肪滴マスク

対物レンズ: 20倍
Scale bar: 10 μm

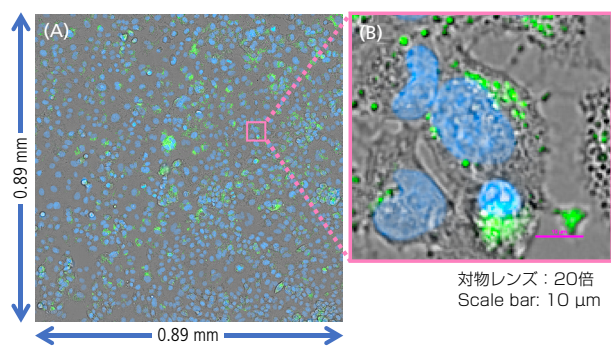


図3. 明視野と蛍光(青: 核、緑: 脂肪滴)のマージ画像

- (A) 20倍対物レンズとDS-Qi2で取得した1ショットの撮像範囲
 (B) (A)の拡大画像

まとめ

- プロプラノロール20 μM以上の濃度条件において、脂肪滴が顕著に形成され、薬物による脂質の蓄積が誘発されました(図4)。
- 同じ焦点面に位置していない直径1 μm以下の小さな脂肪滴であっても、Zスタック画像からEDF画像を構築して定量解析が可能です(図2)。
- 広視野/高精細の25mm FOVカメラDS-Qi2は、ワンショットで広範囲の細胞領域を捉え、信頼性の高い統計データによる定量解析が可能です(図1、図3)。

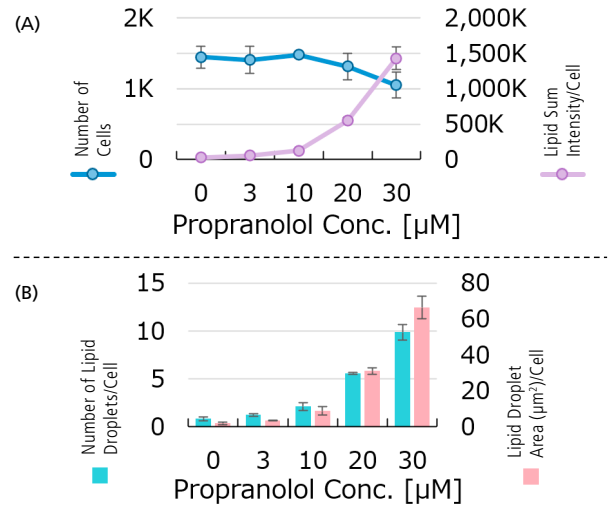


図4. プロプラノロールの各濃度における解析結果

- (A) 細胞数(青、左Y軸)、脂肪滴の総輝度/Cell(紫、右Y軸)
 (B) 脂肪滴の数/Cell(緑、左Y軸)、脂質の面積/Cell(ピンク、右Y軸)
 30 μMの濃度では、細胞数が減少し、脂肪滴の蛍光強度が大幅に増加した。プロプラノロールの濃度依存的に脂肪滴の数と面積が増加した。
 n=3, mean (SD)

謝辞

Lipi-Greenによる脂質染色条件プロトコル確立にご協力をいただいた、株式会社 同仁化学研究所の皆様にご心より感謝します。

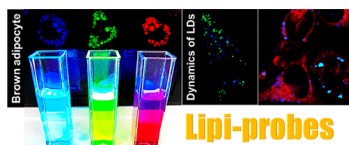
製品情報

dojindo 脂肪滴染色蛍光色素 Lipi-Green

(株式会社 同仁化学研究所)

<https://www.dojindo.co.jp/>

Lipi シリーズは、脂肪親和性の高い低分子蛍光試薬であり、疎水性環境下で蛍光が増強します。また、試薬を添加するだけで生細胞および固定化細胞中の脂肪滴を明瞭に観察することができます。



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。

