



CL-Quant アドオンモジュール 「細胞占有面積率」を用いた HepG2 細胞の増殖評価

<BioStation CT 使用例 >

はじめに

- CL-Quant アドオンモジュール「細胞占有面積率」は、画像解析ソフトウェアCL-Quantと組み合わせて使用することにより、これまで目視により判断していた細胞占有面積率を客観的かつ定量的に計測することができるため、判断基準を標準化する上で役立ちます。
- HepG2細胞はヒトの肝臓のモデル細胞として薬物の毒性評価や代謝試験に汎用されている細胞です。再現性の良い試験結果を得るためには適切な細胞占有面積率での継代や評価を行うことが重要です。CL-Quant アドオンモジュール「細胞占有面積率」は適切な継代やアッセイのタイミングの決定をサポートします。

観察装置

- BioStation CT (Nikon, MLA10000)

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

- 細胞占有面積率 MA-PC-UR-AR01 (Nikon, MLS30201)

細胞

- ヒト肝癌由来細胞株HepG2 (JCRB細胞バンク, JCRB1054)

試薬及び材料

- DMEM, low glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, 11885084)
- Fetal Bovine Serum, certified, United States (Thermo Fisher Scientific, 16000044)
- PBS, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)
- TrypLE™ Select Enzyme (1x), no phenol red (Thermo Fisher Scientific, 12563011)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

方法

PBSとTrypLE™ Selectを用いて剥離したHepG2細胞を、6ウェルプレートの各ウェルに、 0.5×10^5 、 0.75×10^5 、 1.0×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。培地には、10%FBSを加えたDMEMを使用しました。播種した細胞は、BioStation CTで37°C、5% CO₂ 環境下で培養しました。

播種2時間後から6時間毎に3日間、10倍の対物レンズで、ウェル中心部の8×8視野（約 6.4 mm×6.4 mm）の位相差画像を撮影しました。撮影は、ウェルごとに一番初めの視野でオートフォーカス調整したのち、その設定値を用いて同一ウェル内を撮影しました。

得られた画像データは、CL-Quantとアドオンモジュール「細胞占有面積率」を用いて解析し、「CellRegion Area to Image Size Ratio」（視野全体に占める細胞存在領域の面積比）を自動計測しました。操作画面上で細胞が存在している領域のマスク表示と計測数値を確認し、Microsoft Excel®形式で出力しました。出力した数値を「細胞占有面積率 (%)」として、その経時変化をグラフ化し、細胞占有面積率が約30、50、70%となった時期を確認しました。

結果

1.0×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種し3時間毎に観察した条件において、細胞占有面積率(%)が約30、50、70%となったのは、それぞれ14時間、32時間及び50時間後でした(図1)。

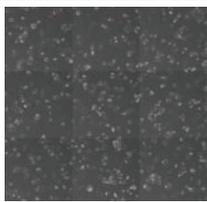
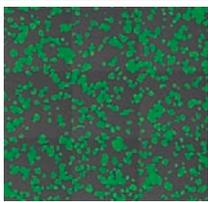
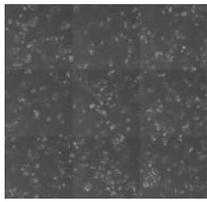
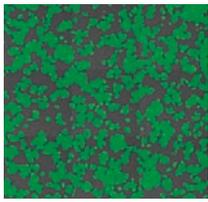
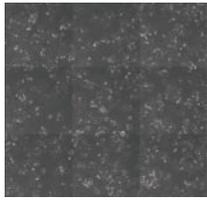
培養時間(時間)	細胞占有面積率(%)	位相差画像	マスク画像
14	31.0		
32	47.9		
50	70.3		

図1: 位相差画像と細胞存在領域を緑色で表示したマスク画像

HepG2細胞を 1.0×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し培養した細胞のうち、参考として 3×3 視野の細胞撮像とマスク画像を示す。得られた細胞占有面積率の数値を百分率(%)に換算して表示。

次に、異なる細胞数で播種されたウェルにおける培養期間全体の細胞占有面積率の経時的変化をグラフ化しました(図2)。細胞播種密度ごとに、所定の細胞占有面積率に達するまでに要する時間を確認することができます。

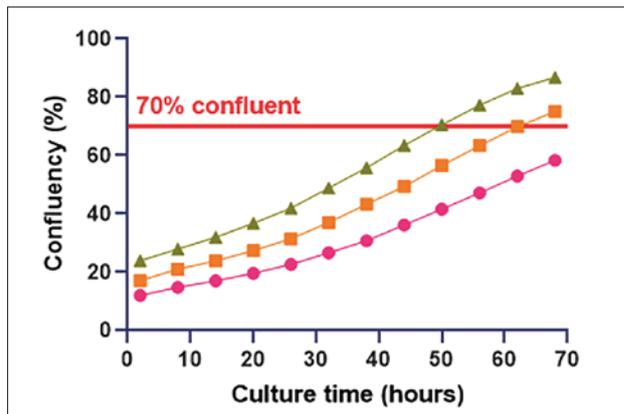


図2: 播種密度の違いによる細胞占有面積率の変化

0.5×10^5 (マゼンタ)、 0.75×10^5 (橙)、 1.0×10^5 (緑)細胞/ウェルでHepG2細胞を播種した各ウェルの細胞占有面積率の経時変化を示す。得られた細胞占有面積率の数値を百分率(%)に換算し、70%の位置に「70%コンフルエント」の基準線を加えた。

まとめ

- CL-Quantとアドオンモジュール「細胞占有面積率」を組み合わせることで、HepG2細胞の培養工程中の位相差画像から自動的に細胞占有面積率を計測することが可能になります。
- CL-Quantの操作画面上のマスク画像を参照することで、細胞の占有領域が適切に認識されているかどうかを簡単に確認することができます。
- 培養工程中の細胞の状態をモニターし、細胞占有面積率の情報を得ることは、アッセイや継代のタイミングの決定に役立ちます。
- 得られた計測数値はMicrosoft Excel®形式で出力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や、ステージを動かさずにスクリーニング可能なBioStudio-T。いずれも細胞に与えるストレスを抑え、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

お問い合わせ先：(株)ニコンインステック

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 東京都品川西大井 1-6-3 (株式会社ニコン 大井ウエストビル 3F)

Tel: 03-3773-8138

www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/



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
www.healthcare.nikon.com/ja/