



CL-Quant アドオンモジュール

「hPSCコロニー占有面積率」を用いた iPS細胞のコロニー占有面積率の計測

<BioStation CT 使用例 >

はじめに

- CL-Quant アドオンモジュール「hPSCコロニー占有面積率」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コロニー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。
- iPS細胞を安定的に維持培養するためには、所定のコロニー占有面積率範囲内で適切に継代作業を行うことが重要です。CL-Quant アドオンモジュール「hPSCコロニー占有面積率」は、適切な継代のタイミング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

- hPSCコロニー占有面積率 MA-PC-4X-AR02 (Nikon, MLS30202)

細胞

- ヒト人工多能性幹(iPS)細胞株 253G1 (京都大学iPS細胞研究所/iPSアカデミアジャパン)

試薬及び材料

- StemFit® AK02N (Ajinomoto, AK02N)
- iMatrix-511 solution (0.5mg/ml) (MATRIXOME, 892011)
- Y-27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, 257-00511)
- TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red (Thermo Fisher Scientific, 12563011)
- PBS, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

方法

AK02N培地で維持培養した253G1細胞のコロニーをTrypLE™ Selectを用いてシングルセルに分散し、iMatrix-511でコートした6ウェルプレートの各ウェルに播種しました。播種した細胞は、Biostation CTで37℃、5%CO₂環境下で培養しました。

播種後、細胞が接着する2時間後から6時間毎に4倍の対物レンズで、ウェル中心部の8×8視野(約16.0 mm×16.0 mm)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「hPSCコロニー占有面積率」を用いて解析し、「Ph-Mask AreaRatio」(視野全体に占める細胞占有面積の比)を自動計測しました。操作画面上でiPS細胞コロニー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「コロニー占有面積率(%)」として、経時変化をグラフ化し、コロニー専有面積率が約30、50、70%となった時期を確認しました。

結果

解析結果より、6時間毎に観察した条件において、コロニー占有面積率(%)が約30、50、70%となったのは、それぞれ110時間、122時間及び134時間後でした。(図1)。

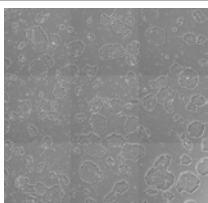
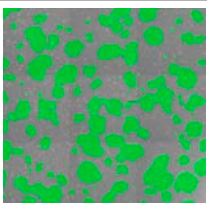
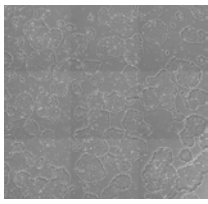
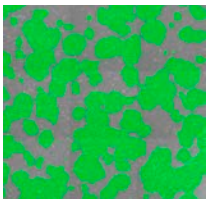
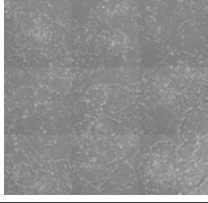
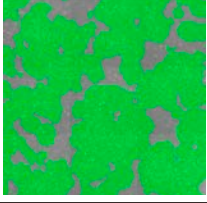
培養時間(時間)	コロニー占有面積率(%)	位相差画像	マスク画像
110	35		
122	54		
134	73		

図1: iPS細胞の位相差画像(左)とコロニー領域を緑色で表示したマスク画像(右)

得られたコロニー占有面積率の数値を百分率(%)に換算して表示。参考として3×3視野の細胞撮像とマスク画像を示す。

また、培養期間全体のコロニー占有面積率(%)の経時変化を図2に示しました。

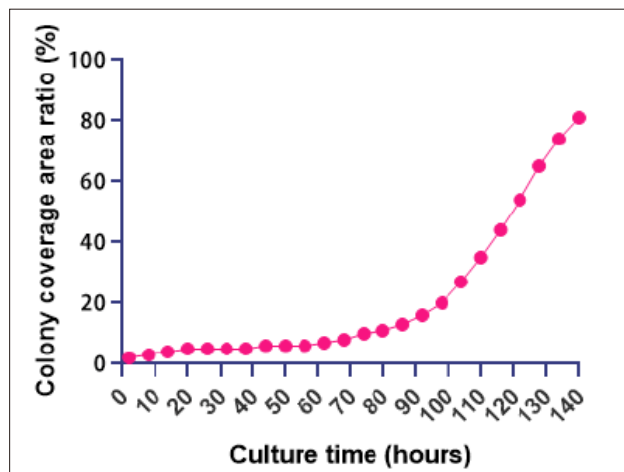


図2: iPS細胞コロニー占有面積率の経時変化

得られたコロニー占有面積率の数値を百分率(%)に換算して表示。

まとめ

- CL-Quantとアドオンモジュール「hPSCコロニー占有面積率」を併用することにより、iPS細胞の位相差画像からコロニー占有面積率を自動的に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、iPS細胞コロニー領域が適切に認識されているかを簡単に確認することができます。
- 培養工程中のiPS細胞の状態をモニターし、コロニー占有面積率の情報を得ることは、継代のタイミングを決定することに役立ちます。
- 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: ㈱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/