



CL-Quant アドオンモジュール

「hPSCコロニー面積パッケージ」を用いた iPS細胞の個別コロニー占有面積等の計測

<BioStation CT 使用例 >

はじめに

- CL-Quant アドオンモジュール「hPSCコロニー面積パッケージ」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、iPS細胞コロニーの一つ一つを個別に認識し、コロニー数、平均面積や総面積を同時に計測することができます。
- iPS細胞を安定的に維持培養するためには、継代時に適切な条件で剥離分散されることが重要です。本アドオンモジュールを用いて、形成されるコロニーサイズの均一性を確認することにより、剥離分散の条件検討、作業者の培養手技のばらつきを簡易的に評価することができますようになります。

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コロニー面積パッケージ AP-PC-4X-AR03 (Nikon, MLS30203)

細胞

- ヒトiPS細胞Tic-FX (JCRB細胞バンク, JCRB1331.01, MRC-5由来, フィーダーフリー培養に適応させたTic細胞(JCRB1331)の垂株)

試薬及び材料

- TeSR™-E8™ Kit for hESC/hiPSC Maintenance (STEMCELL Technologies, 05990)
- Fibronectin bovine plasma (Merck, F1141)
- StemPro™ EZPassage™ Disposable Stem Cell Passaging Tool (Thermo Fisher Scientific, 23181010)
- Cell Scraper S (Sumitomo Bakelite, MS-93100)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates(Corning, 3516)

方法

TeSR™-E8™培地で維持培養したTic-FX細胞をEzpassage™とCell Scraper Sを用いて剥離分散し、Fibronectinでコートした6ウェルプレートの各ウェルにクランプで播種しました。播種した細胞は、BioStation CTで37℃、5%CO₂環境下で3日間培養しました。

播種3日後から12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コロニー面積パッケージ」を用いて解析し、コロニー数「Count」、各コロニーの面積「Ph-Mask Area (μm²)」、コロニーの平均面積「Mean of Ph-Mask Area (μm²)」及び全コロニーの面積の総和「Total of Ph-Mask Area (μm²)」を自動計測しました。操作画面上でiPS細胞の一つ一つのコロニーのマスク表示と計測数値を確認しました。得られた計測数値をMicrosoft Excel®形式で出力し、コロニーの大きさの分布をグラフ化しました。

結果

iPS細胞の各コロニーを個別に認識していることを、マスク表示から確認しました。(図1)。

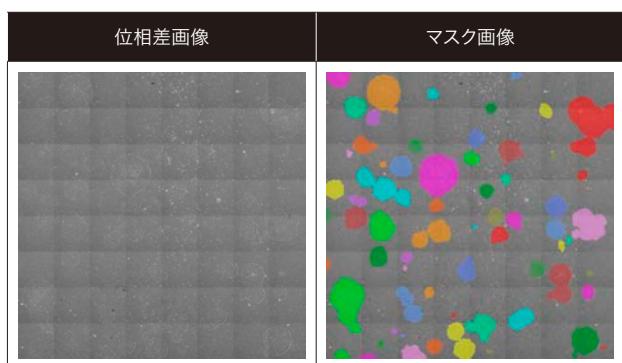


図1: iPS細胞の位相差画像(左)と各コロニー領域マスク画像(右)

位相差画像のコロニー領域をマスクし、ランダムカラーで表示した。

また、自動計測された個別コロニーの面積の分布を図2に示しました。

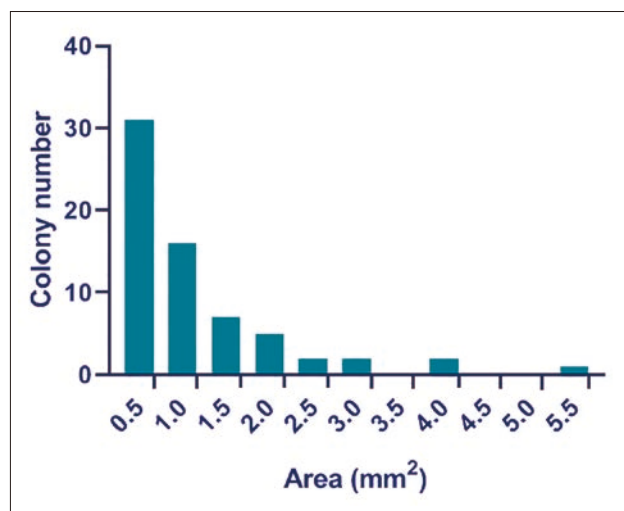


図2: iPS細胞コロニーサイズの分布

得られた計測数値(μm²)をmm²単位に換算して表示した。

まとめ

- CL-Quantとアドオンモジュール「hPSCコロニー面積パッケージ」を組み合わせて使用することにより、iPS細胞コロニーの一つ一つを個別の領域として認識することができます。また、認識された個別コロニーの面積を自動計測し、操作画面上に表示します。
- 得られた計測数値はMicrosoft Excel®形式で出力できます。
- 培養工程中の細胞の状態をモニターし、細胞の各コロニーの面積、平均面積や総面積の情報を得ることは、アッセイや継代のタイミング決定に役立ちます。
- 得られた計測数値はMicrosoft Excel形式で出力できます。

<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観察可能な 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/