



CL-Quant アドオンモジュール

「神経突起長」「神経細胞/クラスター数」 を用いた神経細胞の位相差画像解析

<BioStation CT 使用例 >

はじめに

- CL-Quant アドオンモジュール「神経突起長」「神経細胞/クラスター数」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、神経細胞の神経細胞/クラスター数並びに神経突起長をモニターすることが可能です。
- 神経突起長の測定は、神経疾患に関する候補化合物の効果や毒性の評価において、広く用いられています。本アドオンモジュールは、位相差画像を用いて非染色で神経突起の測定を行うことができ、新しい評価系の構築に役立ちます。

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

- 神経突起長 MA-PC-10X-LE01 (Nikon, MLS30301)
- 神経細胞/クラスター数 MA-PC-10X-CO02 (Nikon, MLS30102)

細胞

- ヒトiPS細胞由来神経細胞: hiPSC-derived GABAergic Neuron from Healthy Donor (Elixigen Scientific, EXGS-QNGSVF-CW50065-1M)

試薬及び材料

- DMEM/F12, no glutamine (Thermo Fisher Scientific, 21331-020)
- Neurobasal™ Medium (Thermo Fisher Scientific, 21103049)
- GlutaMAX™ Supplement (ThermoFisher Scientific, 35050061)
- Penicillin-Streptomycin, Liquid (Thermo Fisher Scientific, 15140-122)
- iMatrix-511 silk (MATRIXOME, 892021)
- Y-27632 2HCl (Selleck Chemicals, s1049)
- Quick-Neuron™ GABAergic Maintenance Medium (Elixigen Scientific, EXGS-QNGM)
- Coster® 24-well TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3526)

方法

iMatrix-511 silkをコートした24ウェルプレートの各ウェルに、神経細胞を 0.5×10^5 、 1.0×10^5 、 1.5×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。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24時間後から6時間毎に5日間、10倍の対物レンズで、ウェル中心部の2×2視野(約1.6 mm×1.6 mm)をカスタム観察地点登録し、カスタムフォーカスにて位相差画像の撮影を行いました。

得られた画像データは、CL-Quantとアドオンモジュール「神経突起長」で解析し、「Ph-Mask LineLength (μm)」(視野全体に占める神経突起長の総和)を自動計測しました。次に、視野サイズ情報を基に単位面積当たりの神経突起長を算出しました。

また、同じ画像に対して、CL-Quantとアドオンモジュール「神経細胞/クラスター数」を用いて神経細胞や神経細胞クラスター数を自動計測しました。

※本アドオンモジュールでは、神経細胞が独立して存在する場合は神経細胞数を計測し、クラスターとして存在する場合にはクラスター数を計測します。また、独立した神経細胞と神経細胞クラスターが混在する場合には、両者を区別せずに計測します。計測結果は「Ph-Mask Component Count」の値として得られます。

最後に、神経突起の総和長と、神経細胞や神経細胞クラスターの数を基に、1個の神経細胞/クラスターあたりの神経突起長(平均値)を算出しました。

結果

1.0×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種したウェルにおいて、播種6日後の神経細胞の画像を図1に示しました。細胞突起部分はアドオンモジュール「神経突起長」を用い、マスク表示しました(図1B)。同様に、細胞体及び細胞クラスター領域はアドオンモジュール「神経細胞/クラスター数」を用いてマスク表示しました(図1C)。

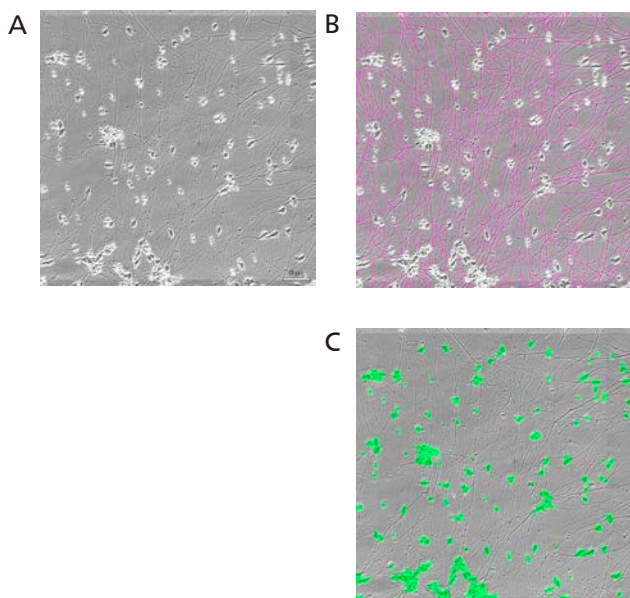


図1: hiPSC-derived GABAergic Neuronの位相差画像とマスク画像

hiPSC-derived GABAergic Neuronを 1.0×10^5 細胞/ウェルの細胞密度で播種し、位相差画像を取得し、解析した。(A) 播種6日後の位相差画像、(B) 神経突起部分(マゼンタ)のマスク画像、(C) 細胞体及び細胞クラスター領域(緑)のマスク画像。なお、撮影した視野の一部を拡大して表示している。

次に、異なる細胞密度で播種されたウェルにおける播種24時間後から5日間の培養期間全体の神経突起長の経時変化を図2に示しました。本アドオンモジュールを用いると、単位面積ごと、あるいは細胞播種濃度ごとに細胞突起長の経時変化を図2のように表示することも可能です。これにより、神経細胞の培養条件や薬物応答の条件を評価することができます。

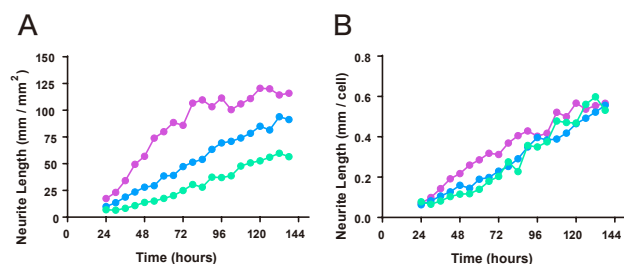


図2: 神経突起長の経時変化

hiPSC-derived GABAergic Neuronを 0.5×10^5 (緑)、 1.0×10^5 (青)、 1.5×10^5 (紫)細胞/ウェルの細胞密度で播種した条件における各計測結果をグラフ化した。

- (a) 単位面積 (1 mm^2) あたりの神経突起領域長
- (b) 神経細胞/クラスター1つあたりの神経突起

まとめ

- CL-Quantとアドオンモジュールを組み合わせることで、ヒトiPS細胞由来のGABAergic Neuronの位相差画像から神経突起長を自動計測し、その結果をCL-Quant操作画面上にて確認することができます。
- アドオンモジュール「神経突起長」と「神経細胞/クラスター数」を併用することにより、神経細胞/クラスターあたりの神経突起長の平均値を算出することが可能になります。
- 得られた数値は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/