



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蛍光画像解析

<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計測することが可能です。
- 神経突起長の測定は、神経疾患に関する医薬品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の蛍光画像を用いた神経突起長の測定は、一般的に用いられている評価方法を簡便に実施する助けになります。

観察装置

- BioStation CT(Nikon, MLY10013)

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-FL-10X-LE02 (Nikon, MLS30302)
- 神経細胞/クラスター数 MA-FL-10X-CO03 (Nikon, MLS30103)

細胞

- ヒトiPS細胞由来神経細胞: hiPSC-derived GABAergic Neuron from Healthy Donor (Elixirgen scientific, EXGS-QNGSVF-CW_ID_-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 (Elixirgen Scientific, EXGS-QNGM)
- -Cellstain®- Calcein-AM solution (Dojindo Laboratories, C396)
- Coster® 24-well TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3526)

方法

iMatrix-511 silkをコートした24ウェルプレートに、 0.5×10^5 、 1.0×10^5 細胞/ウェルの密度で播種しました。播種した細胞は、37°C、5%CO₂環境下で20日間培養後、Calcein-AMを用いた蛍光染色によって可視化しました。Calcein-AM染色は、細胞を0.1 μg/mLのCalcein-AMを含む培地中で37°C、5%CO₂環境下で30分間インキュベートし、その後培地で2回洗浄することにより行いました。

染色直後にBioStation CTで10倍の対物レンズでウェル中心付近の10視野(1視野あたり約0.8 mm×0.8 mm)の細胞の位相差画像と蛍光画像の撮影を行いました。蛍光撮影条件は、励起波長(475nm)のLED出力50%、露光時間150ミリ秒、各ウェルで撮影開始前にマニュアルでカスタム観察地点登録したカスタムフォーカス設定にて行いました。

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、「Ch2-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、同じ蛍光画像に対して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「Ch2-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

1.0×10⁵細胞/ウェルの細胞密度で播種したウェルにおいて、播種20日後の神経細胞の位相差画像(図1A)及びCalcein-AMで染色した蛍光画像(図1B)に示しました。図1Bを基に、アドオンモジュール「神経突起長」を用いて神経突起領域をマスクしました(図1C)。同様に、アドオンモジュール「神経細胞/クラスター数」を用いて神経細胞及びクラスターをマスクしました(図1D)。

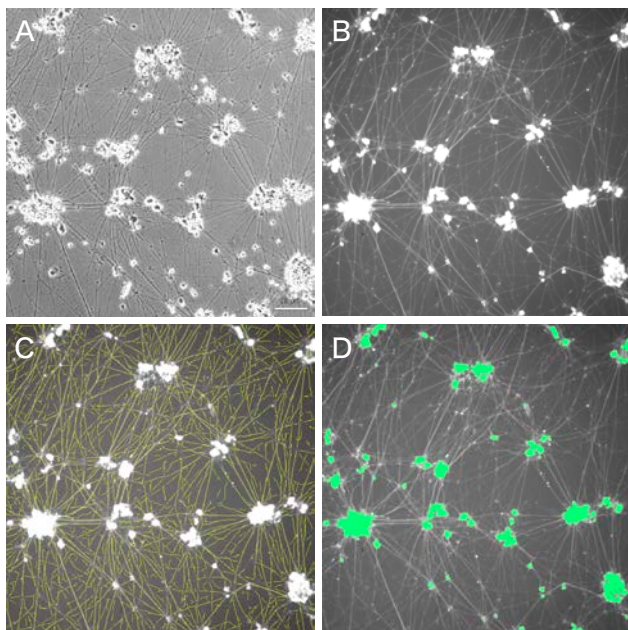


図1:hiPSC-derived GABAergic Neuronの位相差画像、蛍光染色画像、マスク画像

hiPSC-derived GABAergic Neuronを1.0×10⁵細胞/ウェルの密度で播種した。播種20日後の(A)位相差画像、(B)蛍光画像、(C)蛍光画像における細胞突起領域(黄色)のマスク画像、(D)蛍光画像における神経細胞/クラスター領域(緑色)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20日後の神経突起長を計測しました(図2)。

本アドオンモジュールを用いると、細胞当たりの神経突起長、単位面積当たりの神経突起長の合計を図2のように表示することも可能です。本機能は、神経細胞の培養条件や薬物応答の条件の評価に有用です。

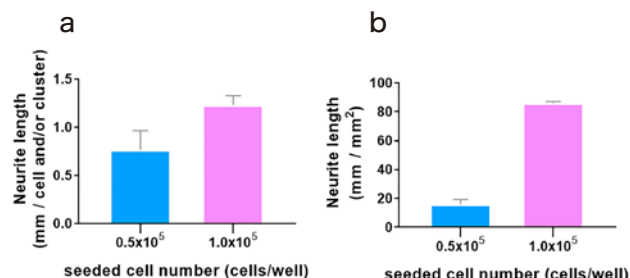


図2:播種密度による神経突起長への影響

hiPSC-derived GABAergic Neuronの蛍光画像から神経突起長及び神経細胞/クラスター数を計測した値をグラフ化した。

(a)「神経細胞/クラスター1個」あたりの神経突起長

(b)面積1mm²あたり神経突起長

なお、エラーバーは10視野の標準誤差を示す。

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、長期間培養後のヒトiPS細胞由来のGABAergic Neuronの蛍光画像から神経突起長を計測することができます。
- アドオンモジュール「神経突起長」及び「神経細胞/クラスター数」を併用することにより、神経細胞や神経細胞クラスターあたりの神経突起長を算出することが可能になります。
- 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。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

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/