

APPLICATION NOTE

正立顕微鏡 ECLIPSE LV100ND (反射/透過照明併用型)
倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2シリーズ

反射明視野を用いたセルカルチャーインサートの観察

血液脳関門 (Blood-brain barrier、以下BBB) は、脳の血管と脳細胞間の物質交換を制限する機構であり、神経機能に最適な環境を常に維持する役割を持つ。BBBの構成細胞である血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの三種類で構成されるBBBキットは、セルカルチャーインサートを用いたインビトロモデルであり、脳疾患の治療薬開発において、薬物の脳内移行性検定や化合物のBBBに及ぼす影響および受容体の細胞膜極性に関する抑制研究や、疾患モデル解析などに広く用いられる。BBBキットはセルカルチャーインサートの不透明膜上下およびウェル内部に培養中の細胞の可視化において課題がある。例えば、薬剤評価の準備段階では細胞の生育状態をライブセル観察で確認することは難しいため、生育不順などで使用基準に満たない場合も、評価後に免疫染色などで確認して初めて判明する。本アプリケーションノートでは、BBBキットなどに利用されるセルカルチャーインサートで培養した細胞の観察法について紹介する。

キーワード：反射明視野、創薬、血液脳関門、ライブセル、セルカルチャーインサート

実験

サンプル：ラット型 BBB キット™ (RBT-24H) [ラット由来初代培養BBB関連細胞、セルカルチャーインサート (cellQART® 9320402, SABEU) および培養液により構成]/ファーマコセル株式会社

培養：解凍後のラット型BBBキット™に加温済みの培養液を添加後、37℃ CO₂インキュベータにて培養開始。2-3時間培養後に1回目、翌日に2回目の培地交換を行い、4日目以降から実験を開始した。

1. 内皮細胞の正立顕微鏡による観察

方法

- ①正立顕微鏡で培養5日目の内皮細胞のライブセル観察を行った。
NIS-ElementsのLook-up Tables (LUTs)機能を用いた可逆的画像強調を行って反射明視野像を取得した。
- ②固定し、抗GAPDH抗体およびヘキストを用いて染色した。
- ③固定した内皮細胞の反射明視野像と蛍光像を取得し、ライブセル観察した反射明視野像と比較した。

装置

- ・正立顕微鏡：LV100ND
- ・対物レンズ：TU Plan Fluor EPI 10x (NA 0.30)
- ・ソフトウェア：NIS-Elements
- ・開口絞り：最小付近で標本に応じて調整
- ・カメラ：浜松ホトニクスORCA-Flash4.0

結果

- ・ライブセル観察した内皮細胞の反射明視野像では、黒い領域が白い領域に縁どられる形で、視野全体に数多く存在していることが確認された。固定後の反射明視野像のほうが、ライブセル像よりもコントラストがやや低下していたが、見え方は同様だった。
- ・固定後の反射明視野像と抗GAPDH抗体染色像を比較した結果、反射明視野像の黒い領域が細胞核に相当し、白い領域に縁どられている個々の領域が細胞に相当することが確認できた。
- ・正立顕微鏡で反射明視野観察を行うことで、生きたまま非染色で内皮細胞の様子を確認できることがわかった。

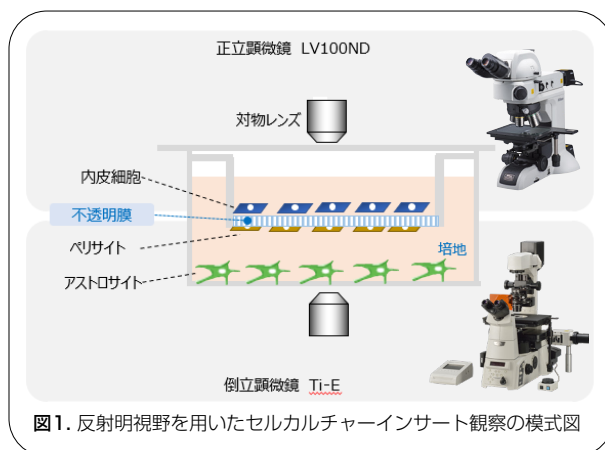


図1. 反射明視野を用いたセルカルチャーインサート観察の模式図

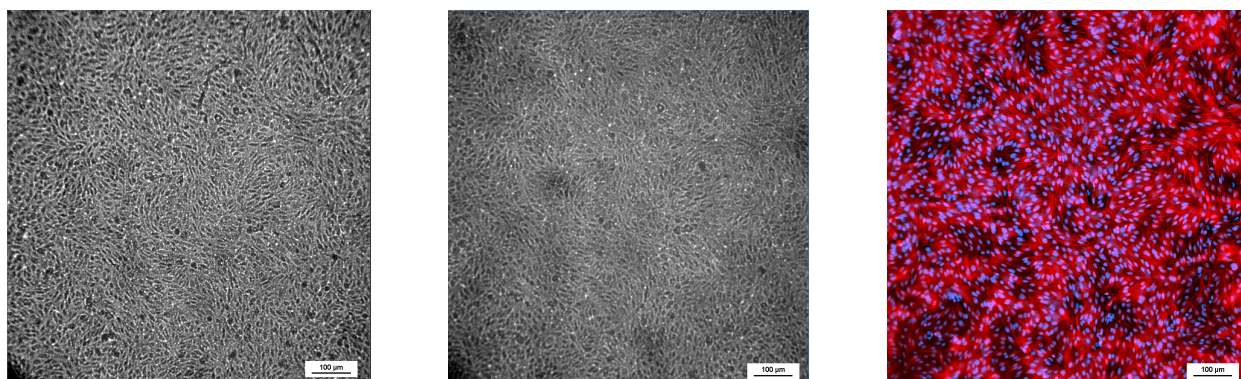


図2. 反射明視野観察法でライブセル観察した、不透明膜上に培養したラット由来初代培養内皮細胞（左）、固定したラット由来初代培養内皮細胞の反射明視野画像（中）と、抗GAPDH抗体染色（細胞質および細胞膜、赤）およびヘキスト染色（細胞核、青）の重ね合わせ画像（右）

2. ペリサイトおよびアストロサイトの倒立顕微鏡による観察

方法

- ①ペリサイトをヘキストとカルセインで、アストロサイトをヘキストとCellMask™ Deep Redでそれぞれ染色した。
- ②倒立顕微鏡で培養4日目のペリサイトおよびアストロサイトのライブセル観察を行った。NIS-ElementsのLUTs機能を用いて反射明視野像を取得した。その後、同視野の蛍光像を取得して反射明視野像と比較した。

装置

- ・ 倒立顕微鏡Ti-E
- ・ 対物レンズ：TU Plan Fluor EPI 10x (NA 0.30)
- ・ ソフトウェア：NIS-Elements
- ・ 開口絞り：最小付近で標本に応じて調整
- ・ カメラ：浜松ホトニクスORCA-Flash4.0

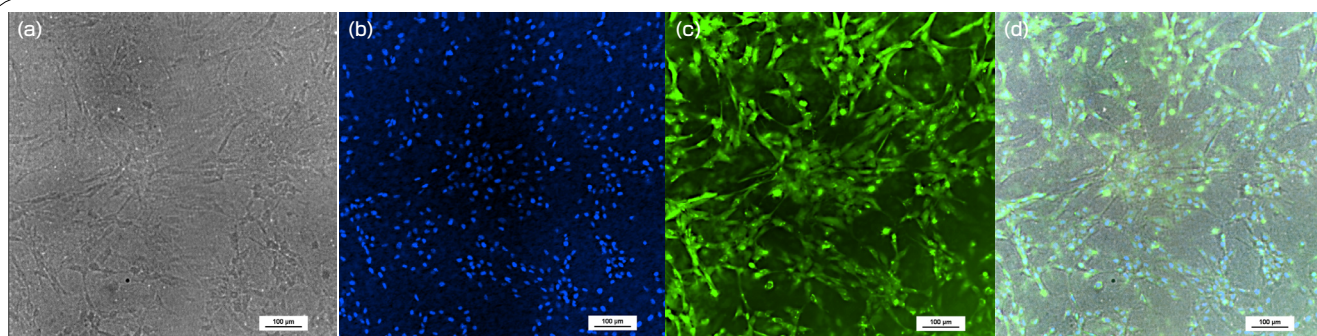


図3. 反射明視野観察法でライブセル観察した、不透明膜下に培養したラット由来初代培養細胞のペリサイト (a)、ヘキスト染色の細胞核(b)、カルセイン染色の細胞質(c)、反射明視野像(a)と(b)(c)の重ね合わせ画像 (d)

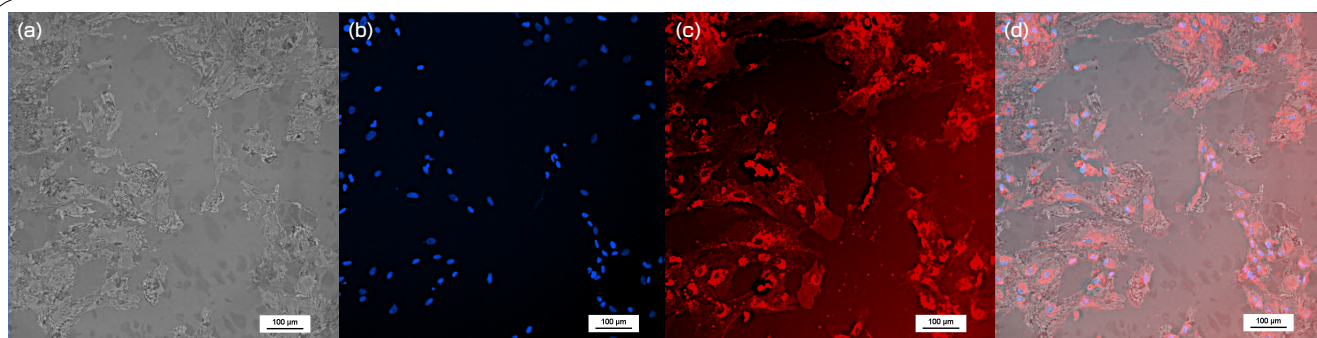


図4. 反射明視野観察法でライブセル観察した、ウェル底面に培養したラット由来初代培養細胞のアストロサイト (a)、ヘキスト染色の細胞核(b)、CellMask Deep Red染色の細胞質(c)、反射明視野像(a)と(b)(c)の重ね合わせ画像 (d)

結果

- ・ 図3より、不透明膜下に培養したペリサイトをライブセル観察した反射明視野像において、周辺よりも暗く見える領域がカルセインのシグナルと一致することが確認できた。
- ・ 図4より、ウェル底面に培養したアストロサイトをライブセル観察した反射明視野像において、周辺よりも明るく見える領域がおおよそCellMask Deep Redのシグナルと一致することが確認できた。
- ・ 倒立顕微鏡で反射明視野観察を行うことで、生きたまま非染色でペリサイトとアストロサイトの様子を確認できることがわかった。

まとめ

反射明視野観察によって、セルカルチャーインサートの不透明膜上下およびウェル内に培養中の細胞の、ライブセルイメージングが可能となる。リアルタイムで生育状態を確認した上で、BBBモデルでの薬剤応答などの試験に利用できるため、試験後の細胞状態評価のために細胞を固定・染色するなどの作業が不要となり、業務効率化を図ることができる。

製品情報

正立顕微鏡 ECLIPSE LV100ND (反射/透過照明併用型)

透過照明による明視野・位相差・DIC・偏光観察のほか、高輝度ハロゲンランプ内蔵の反射照明装置を利用した明視野・蛍光・DIC・偏光観察にも対応します。



対物レンズ TU Plan Fluor EPI 10X

高NA (0.3) と長作動距離 (17.5 mm) を両立した、CFI60-2対物レンズ。反射観察に最適化されており、色収差補正に優れているため、鮮明でコントラストの高い画像が取得できます。



倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2シリーズ

視野数25の広視野により、サンプルの広範囲を効率的に取得できます。マニュアルモデルのほか、操作アシストガイドを搭載したモデルや、多次元画像取得にも対応する電動モデルをラインナップ。

