

# OrganoPlate<sup>®</sup>を用いて培養した神経細胞の 3Dイメージング手法 ～広域観察からシングルセル観察まで～

薬剤開発のプロセスにおける神経毒性評価や、神経疾患研究における機構解明を進める際に、従来の動物モデルの代替となる、ヒト中枢神経モデルを*in vitro*の系において構築することは重要である。MIMETAS社の3D組織培養プラットフォームであるOrganoPlate<sup>®</sup>を利用することにより、ヒトiPS細胞由来の神経細胞を用いて*in vitro*で3D神経モデルを構築し、スクリーニング等に利用可能となる。本アプリケーションノートでは、OrganoPlate<sup>®</sup>上に培養した神経細胞の、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いたイメージング手法について紹介する。

キーワード：3D組織培養、神経細胞、共焦点イメージング

## 実験の概要

3D組織培養プラットフォームOrganoPlate<sup>®</sup>（製造元：MIMETAS）は、マイクロ流路を用いた灌流により、共培養や、管状構造を持つ組織の作製、生体に近い微小環境の再現が可能なシステムである。OrganoPlate<sup>®</sup> 3-lane 40は、1つのゲル導入用レーンと2つの灌流用レーンを持つ40個の組織培養チップで構成される（図1）。

中央のチャンネルにゲルを導入後、上部のチャンネルにiPS細胞由来神経細胞を播種し、OrganoFlow<sup>®</sup>を使用してCO<sub>2</sub>インキュベーター内で灌流培養した。その後、固定染色サンプルを作成し観察を行った。

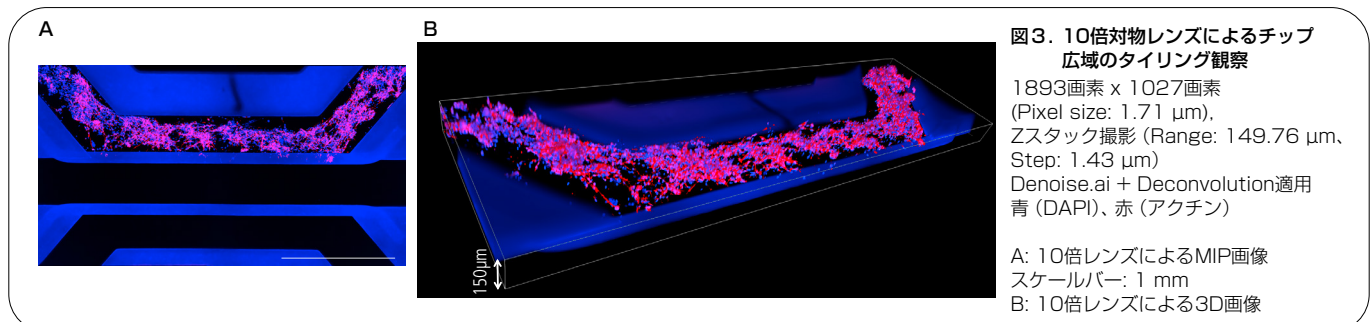
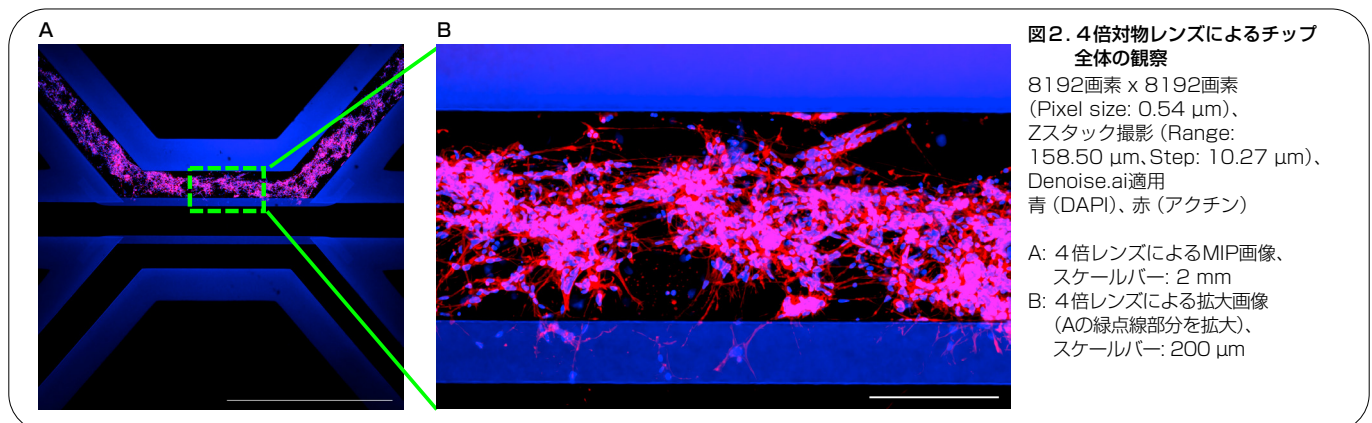
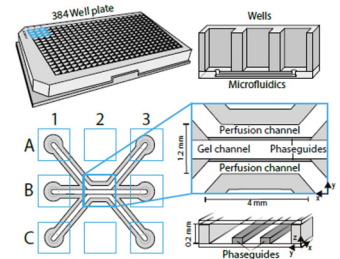
顕微鏡：AX/AX R

対物レンズ：CFI Plan Apochromat Lambda 4X (NA 0.20) (図2)、CFI Plan Apochromat Lambda 10X (NA 0.45) (図3)、CFI Apochromat LWD Lambda S 20XC WI (NA 0.95) (図4)、CFI Apochromat Lambda S 60X Oil (NA 1.40) (図5)

## 広域観察によるサンプル状態の観察

OrganoPlate<sup>®</sup> 3-lane 40に播種されたサンプル全体の状態を確認するためには広域観察が有用である。共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX Rで4倍対物レンズを用いると、ワンショットでチップの全体を捉えることができる（図2A）。また、高解像度の画像取得により、個々の細胞の形態の確認が可能となる（図2B）。10倍対物レンズを用いると、1×2枚のタイリング観察によってチップの広域を捉えることができる（図3A）。またZスタック撮影により、チップ内全体に存在する細胞の空間配置を確認できる（図3B）。

図1.



## 高倍対物レンズによるシングルセルの観察

OrganoPlate® 3-lane 40は底面がガラスで構成されているため、高倍対物レンズを使用したシングルセルレベルの形態観察が可能である。20倍水浸対物レンズを用いると、ワンショットでチャンネル2レーン分の視野を捉えることができる(図4A)。また、チャンネルの高さの0.20 mmの範囲をカバーするZスタック観察が可能である(図4B)。60倍油浸対物レンズを用いると、底面近傍に存在する個々の細胞の細胞体や神経突起の形態を高精細に観察することができる(図5A, B)。

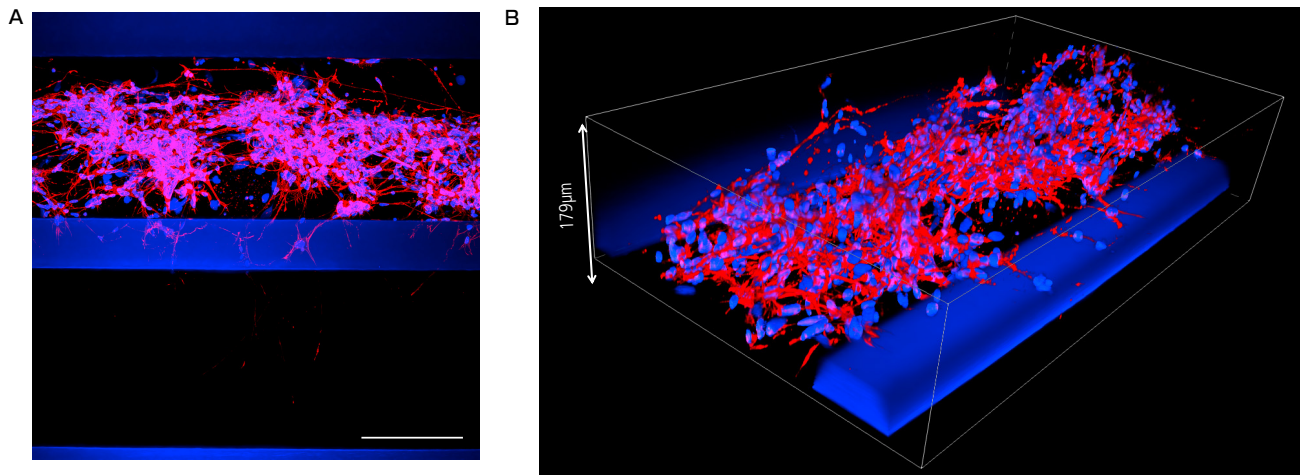


図4. 20倍水深対物レンズによるZスタック観察

1024画素 x 1024画素 (Pixel size: 0.86 μm)、Zスタック撮影 (Range: 178.86 μm, Step: 0.52 μm)、Denoise.ai + Deconvolution適用、青 (DAPI)、赤 (アクチン)

A: 20倍レンズによるMIP画像、スケールバー: 200 μm

B: 20倍レンズによる3D画像

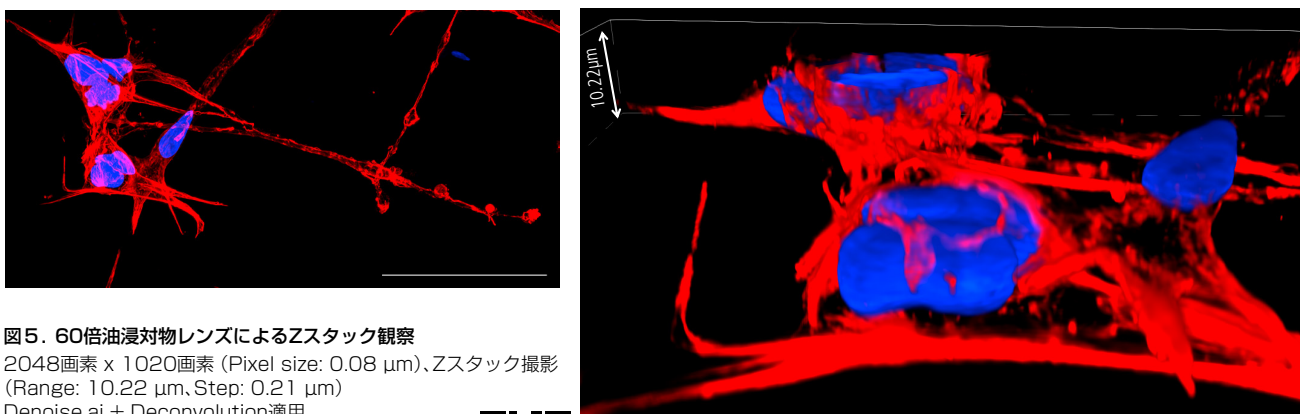


図5. 60倍油浸対物レンズによるZスタック観察

2048画素 x 1020画素 (Pixel size: 0.08 μm)、Zスタック撮影 (Range: 10.22 μm, Step: 0.21 μm)

Denoise.ai + Deconvolution適用

青 (DAPI)、赤 (アクチン)

A: 60倍レンズによるMIP画像、スケールバー: 50 μm

B: 60倍レンズによる3D画像



動画

## まとめ

MIMETASのOrganoPlate®を利用して構築した*in vitro*神経モデルサンプルについて、チップ全体の広域観察からシングルセルの形態観察までを、広視野を特長とする共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いてイメージング可能であることが確認できた。

## 製品情報

# MIMETAS

## OrganoPlate® 3-lane 64

(Product code: 6405-400-B 製造元: MIMETAS)

OrganoPlate® 3-lane 64は、64個の独立したチップ内にゲル導入用と2つの灌流用の合計3つのレーンが構成されています。OrganoPlate® 3-lane 64は自動化ワークフローに最適化されているためデータの再現性を向上させることができます。上・内皮細管のApicalとBasal側からアクセスできるため毒性スクリーニングを目的としたバリアアッセイや輸送試験などに利用することができます。



製品に対するお問い合わせ：  
ミメタスジャパン株式会社



## 共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R



AX/AX Rは、従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25 mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に撮影でき、光毒性を低減します。AX Rのレゾナントスキャナーは、2K x 2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム(2048 x 16画素)の高速取得により、生きたサンプルの変化や反応を逃さず捉えます。

