

APPLICATION NOTE

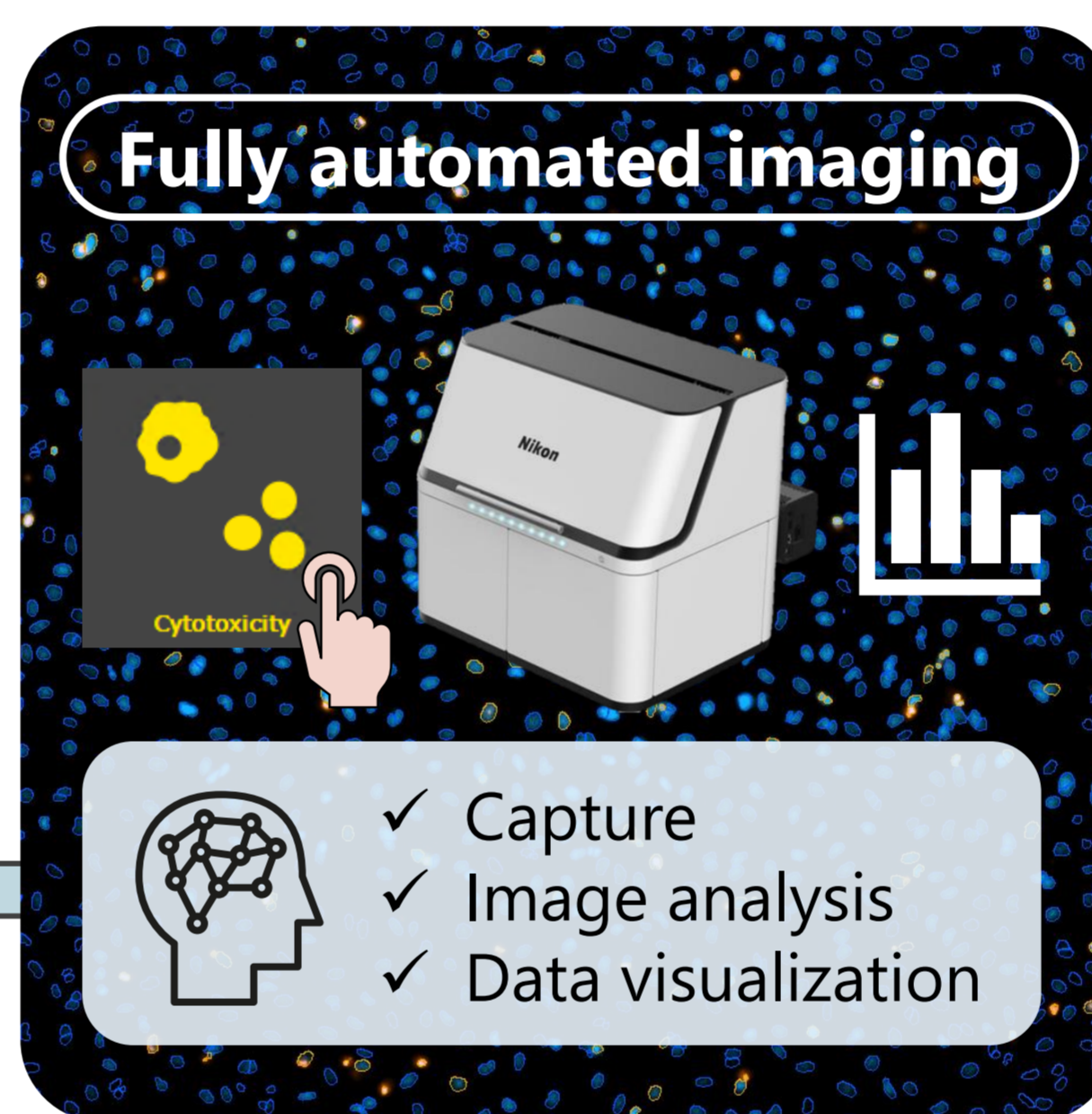
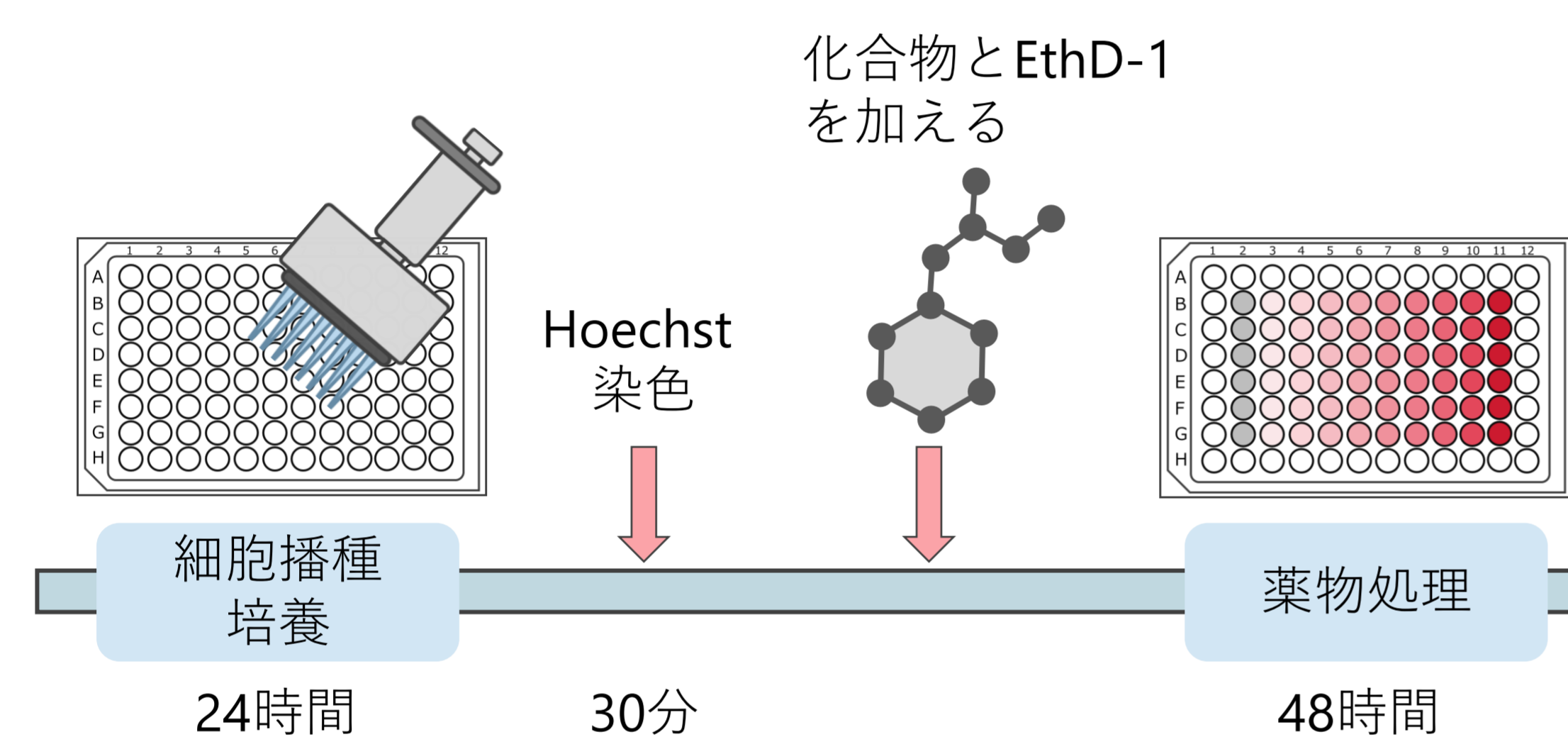
 Smart Imaging System ECLIPSE Ji
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
 Cytotoxicity

AI-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いた細胞毒性の解析

ECLIPSE Ji は、画像統合ソフトウェアNIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得から解析、グラフ作成まで自動で実行できるSmart Experimentを搭載しています。事前に学習させたArtificial Intelligence (AI) と定義済みのイメージングプロセスが画像取得と解析条件の設定を自動で最適化するため、簡単な操作で可視化されたデータやEC₅₀の情報が得られます。細胞毒性の解析は、化合物や分子標的薬の薬理作用、細胞培養製品の開発、生命現象の解明など、さまざまな細胞生物学の研究で利用されている汎用的なアッセイです。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのCytotoxicityモジュールを使用して、スタウロスポリンの用量依存的な細胞死の誘導を可視化し、EC₅₀を算出して薬物の効果を定量化する例を紹介します。

キーワード：細胞毒性、Live / Dead、細胞の生存率、自動設定、EC₅₀、用量反応曲線

実験の概要



Key features

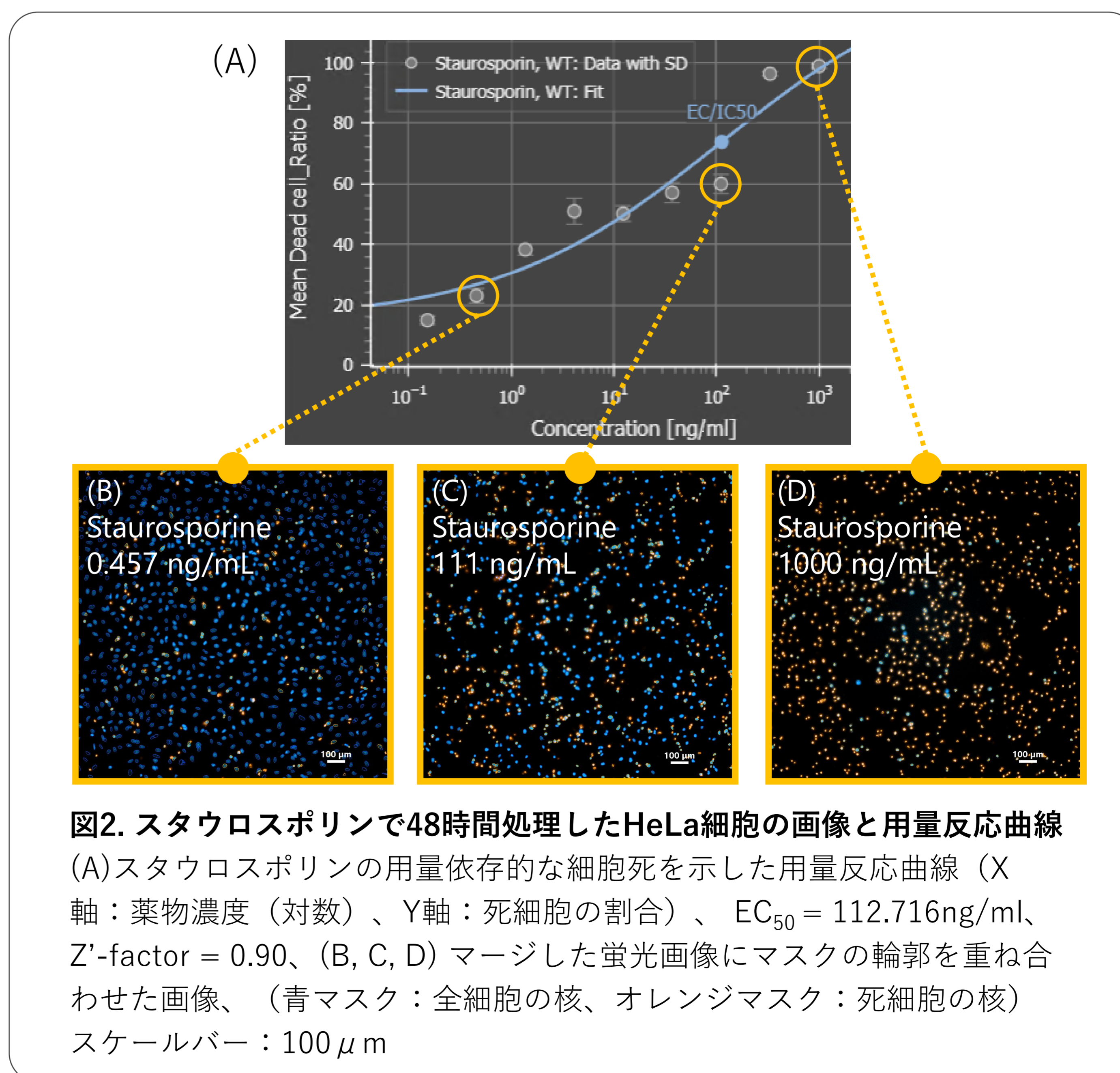
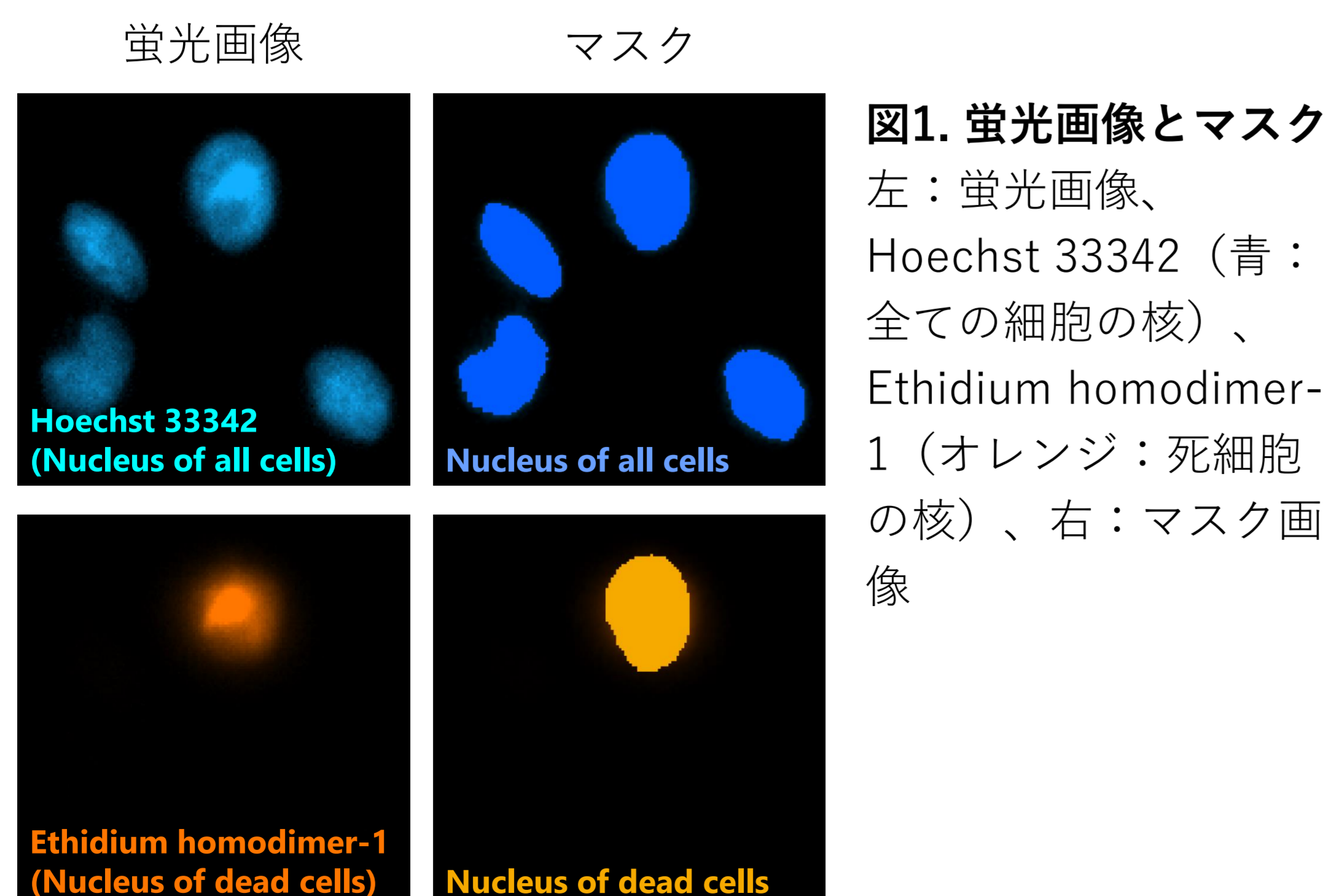
- ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成まで自動で実行
- ✓ 面倒なAFの設定が不要
- ✓ 生細胞と死細胞の割合を計測
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ 用量反応曲線を自動で作成
- ✓ EC₅₀/IC₅₀を自動で算出
- ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 96ウェルプレートにHeLa細胞を播種し、24時間培養。(2) Hoechst 33342を含む培地に交換し、30分間インキュベート。(3) EthD-1を含む培地で被験物質のスタウロスポリンを10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して48時間、細胞を処理。4) 培地を交換せずに、ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Cytotoxicityアイコンを選択して自動で画像取得と解析を実施した。

結果

検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)
全ての細胞の核	Hoechst 33342	352/461
死細胞の核	Ethidium homodimer-1	528/617
倍率	視野 (FOV)	
10X	1.76 x 1.76 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件



結果

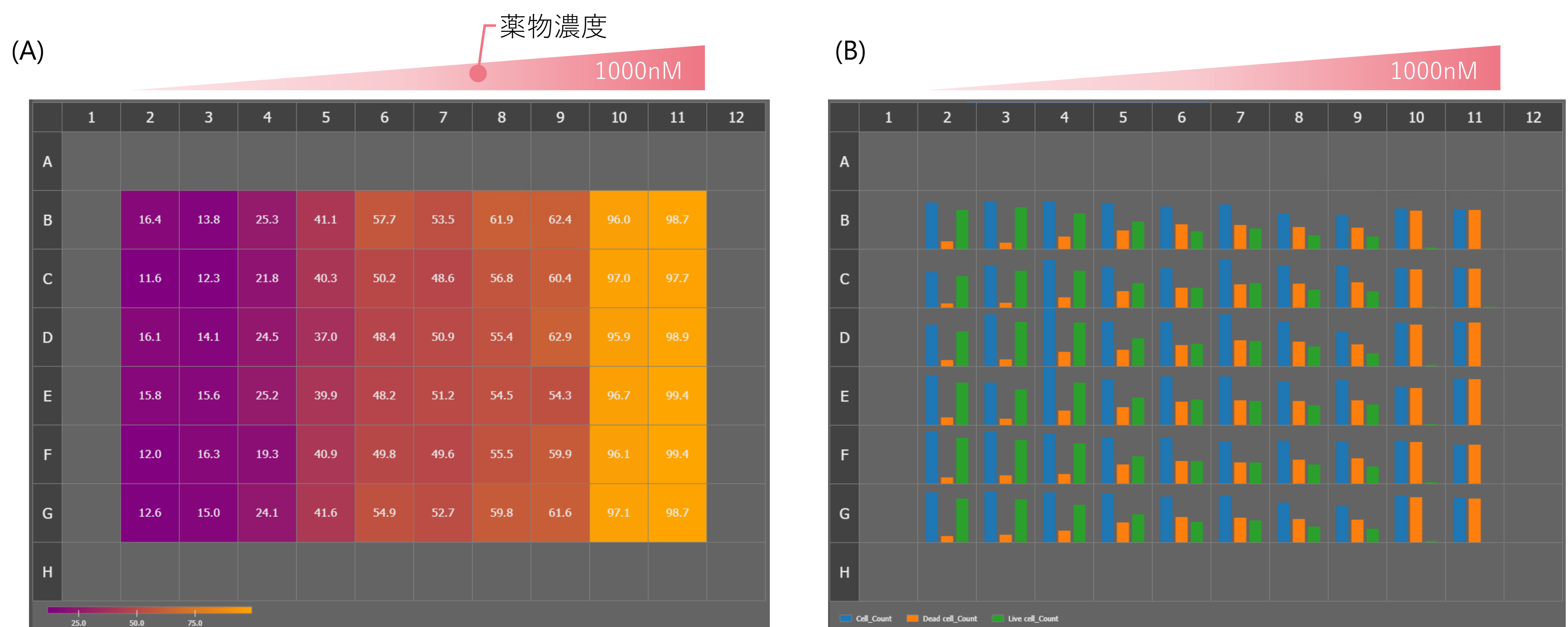


図3. 解析結果

(A) 死細胞数の割合を表示したヒートマップ

(B) 細胞数をウェルごとに表示した棒グラフ（青：全細胞数、オレンジ：死細胞数、緑：生細胞数）、プレートマップビュー表示で各ウェルにおける薬物の反応を直感的に確認できます。

Smart Experimentで実験を自動化し、プロセス数を削減

従来の手法：人間による入力

1. ウェルプレートの種類を選択
2. ウェルプレートのアライメント
3. 対物レンズを選択
4. 波長を選択
5. 露光条件の設定
6. オートフォーカスの設定
7. サンプル（薬物）情報の入力
8. 二値化のパラメーターを設定
9. 計測項目の設定
10. グラフ作成

Jiでは
設定不要

Jiでは
設定不要

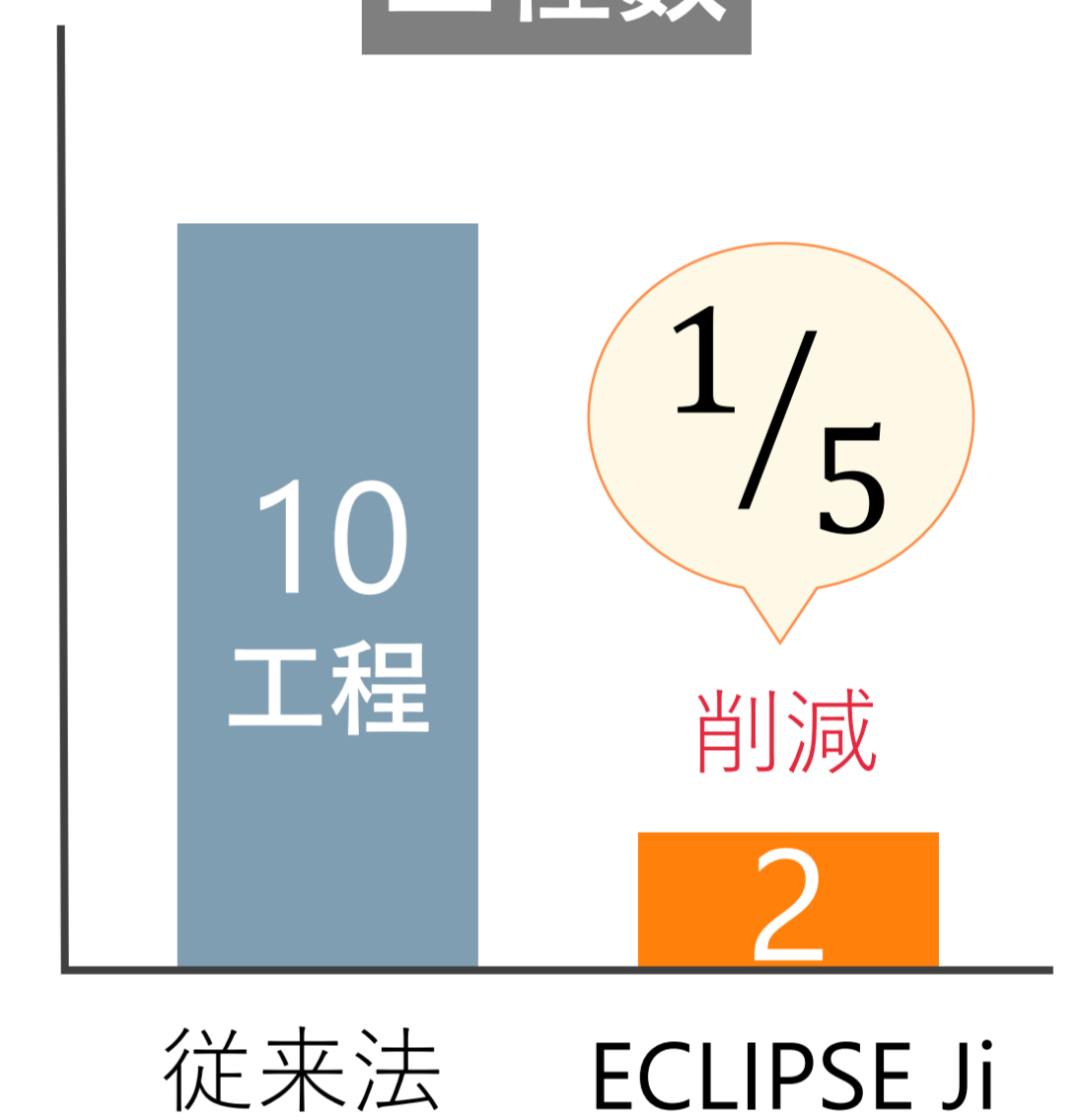
Smart Experiment

1. 実験のアイコンを選択
2. サンプル（薬物）情報の入力

\ 設定を簡略化 /

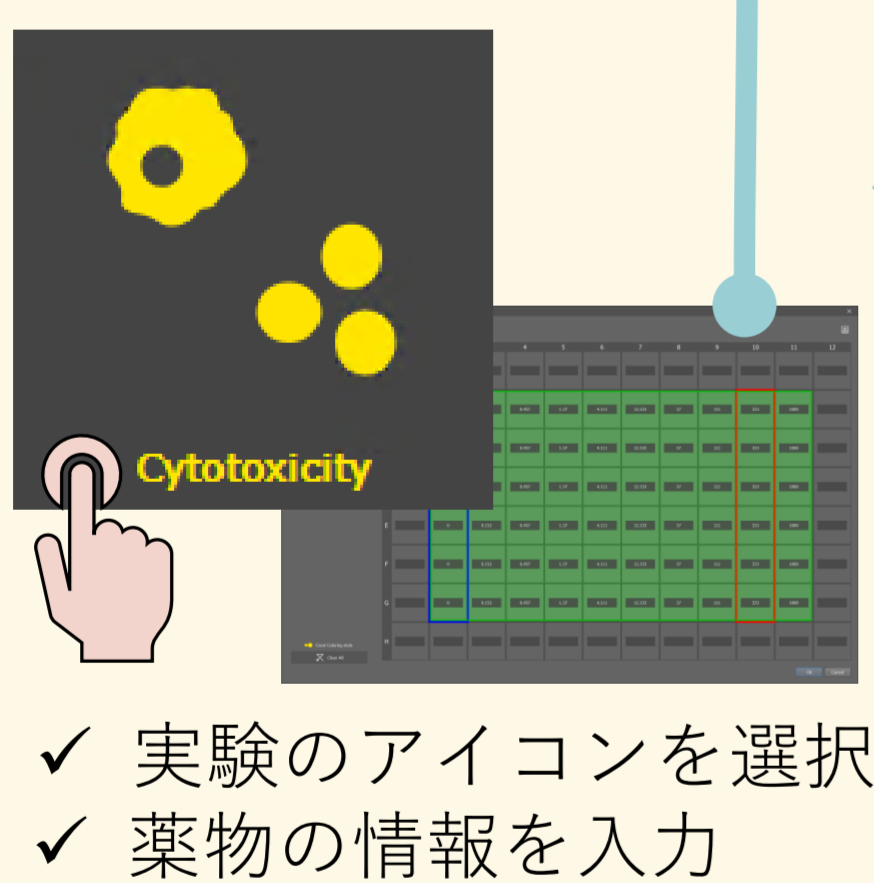


工程数



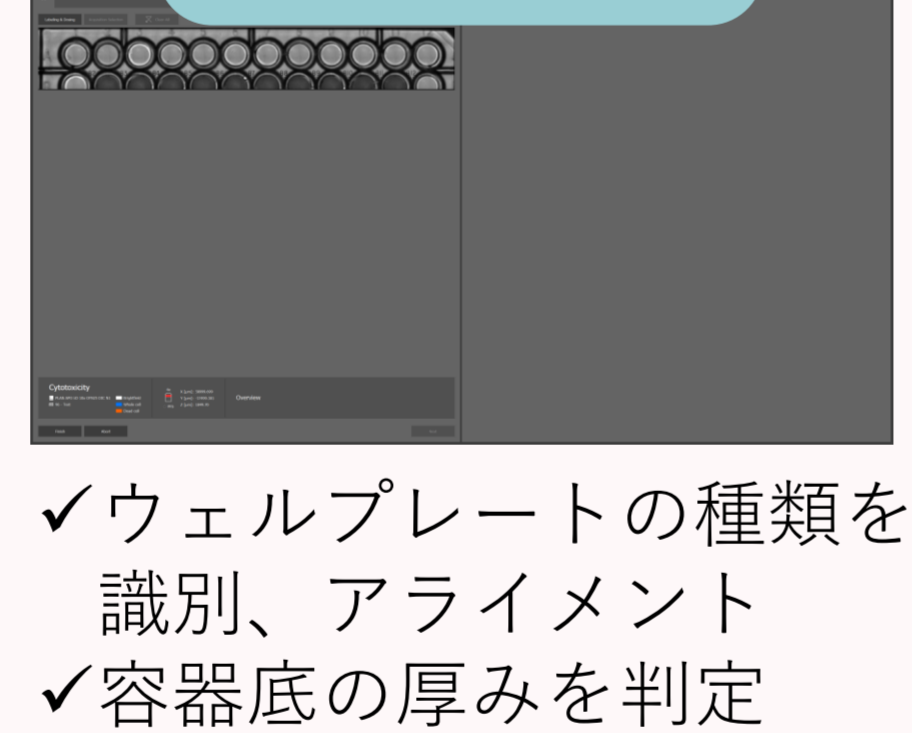
Smart Experiment のワークフロー

人間による入力



完全に自動化されたプロセス

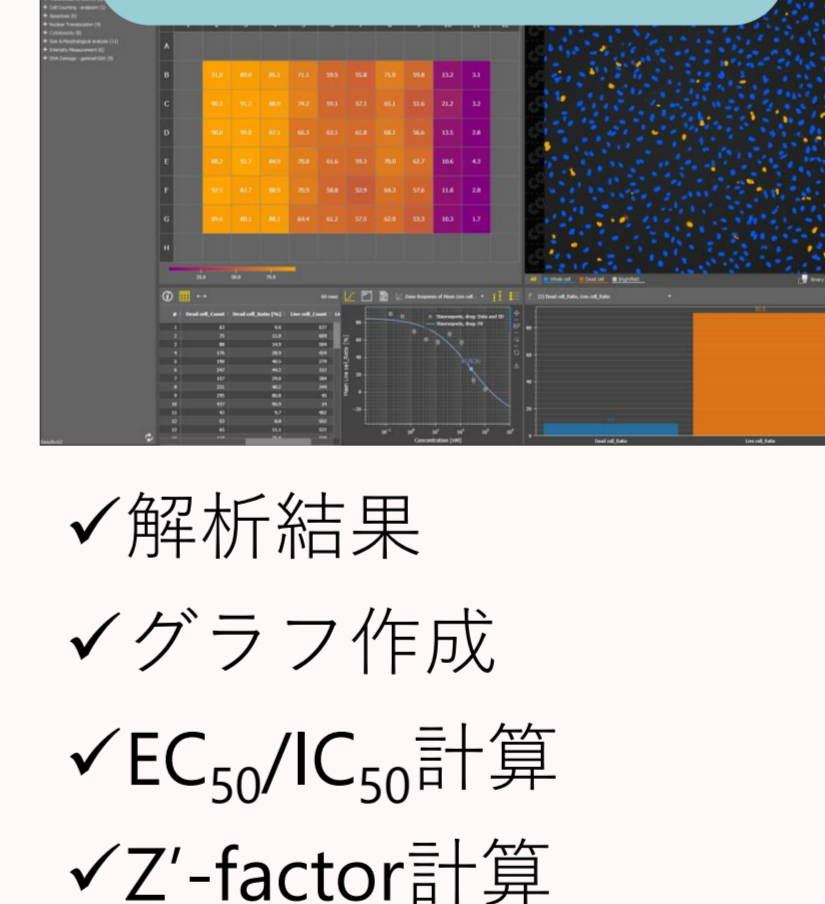
オーバービュー



プレビュー・画像取得



解析・グラフ表示



レポート



まとめ

- ✓ スタウロスポリンの用量依存的な死細胞の割合の増加を確認することができました。
- ✓ 生細胞と死細胞の割合を計測し、自動で用量反応曲線を作成し、EC₅₀を算出できました。
- ✓ Smart Experimentは、画像の取得から解析、グラフ作成まで全自動で実施できます。
- ✓ ウェルプレートをJiに設置して、Cytotoxicity assayのアイコンを選択し、サンプルの情報を入力するシンプルな操作です。今回の実験条件では、撮影開始からグラフ表示まで約20分で実施できました。

- ✓ 厚みのあるプラスチックボトムマルチウェルプレートでもCellFinder.aiが自動でフォーカスを合わせるため、複雑なオートフォーカスの設定は不要です。
- ✓ 面倒な設定は、AIに任せて研究者はより創造的な研究活動に専念できます。

サンプル作成のプロトコル

HeLa細胞を96ウェルプレートに 6×10^3 cells/wellの密度で播種し、37°C、5% CO₂インキュベーター内で24時間培養。Hoechst 33342 (2 μg/ml) を含む培地に交換し、37°C、5% CO₂インキュベーター内で30分間染色。4 μM EthD-1を含むFluoroBright DMEMで希釈したStaurosporinを0 nM, 0.152 nM, 0.457 nM, 1.41 nM, 4.11 nM, 12.3 nM, 37 nM, 111 nM, 333 nM, 1000 nMの濃度で各6ウェルに加える。細胞をスタウロスポリンで48時間、37°C、5% CO₂インキュベーター内で処理する。死細胞の剥離を防ぐため、培地を交換せずにウェルプレートをECLIPSE Jiに設置して画像取得と解析を実行。

材料と試薬

細胞培養																																																																																																																						
細胞	HeLa (RIKEN RCB0007)																																																																																																																					
増殖培地	MEM + 10%FBS + 1%Pc/Sm																																																																																																																					
培養容器	Falcon® 96 well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate (Corning, 353072)																																																																																																																					
被験物質																																																																																																																						
化合物	Staurosporin																																																																																																																					
試験濃度	Negative control: 0 nM, Positive control: 1000 nM To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: (0) 0 nM, (1) 0.152 nM, (2) 0.457 nM, (3) 1.41 nM, (4) 4.11 nM, (5) 12.3 nM, (6) 37 nM, (7) 111 nM, (8) 333 nM, (9) 1000 nM																																																																																																																					
プレートマップの例	<table border="1"><thead><tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr></thead><tbody><tr><th>A</th><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td></tr><tr><th>B</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>C</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>D</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>E</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>F</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>G</th><td>b</td><td>(0)</td><td>(1)</td><td>(2)</td><td>(3)</td><td>(4)</td><td>(5)</td><td>(6)</td><td>(7)</td><td>(8)</td><td>(9)</td><td>b</td></tr><tr><th>H</th><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td><td>b</td></tr></tbody></table> <p>“b” : blank well</p>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b	H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																										
B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b																																																																																																										
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b																																																																																																										

Tips

Cytotoxicity assayは、生細胞と死細胞の割合を計測するアッセイです。一般にDAPIはライブセルの核染色を染色できません。DAPIではなく、Hoechst 33342で全ての細胞の核を染色してください。また、薬物処理後に洗浄を実施すると死細胞がウェルプレートの底面から剥離して、定量解析の精度が低下します。そのため、薬物処理後は細胞を洗浄や固定をせずに画像取得を行ってください。

試薬		
製品名	製品番号	メーカー名
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Thermo Fisher Scientific
FluoroBrite™ DMEM	A1896701	Thermo Fisher Scientific
Staurosporine from Streptomyces sp.	S5921	Sigma-Aldrich
-Cellstain®- Hoechst 33342 solution	H342	Dojindo Laboratories
LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, Ethidium homodimer-1 (EthD-1)	L3224	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich

□ 対応容器*

- ・ 24, 48, 96 ウェルプレート

* ガラスおよびポリスチレン底のウェルプレートに対応しています。画質よりも底面への細胞の接着を優先する場合は、ポリスチレン底のウェルプレートを使用してください。

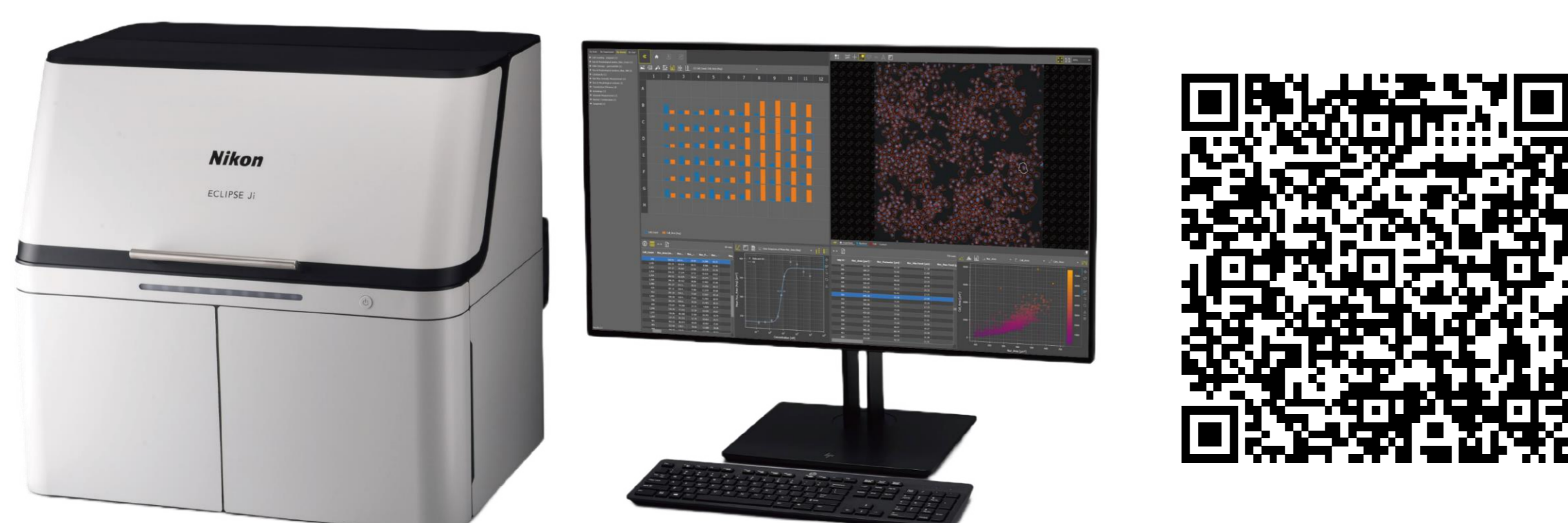
参考文献

Chae, HJ, *et al.*, Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* 42 (4):373-81 (2000).

製品情報

Smart Imaging System ECLIPSE Ji

ECLIPSE Jiは、AI-Driven全自動イメージングシステムです。NIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得・解析・グラフ作成をシームレスに自動で実行できます。人による高度な判断が必要なオートフォーカスの設定にはAIが最適な焦点面を見つけるCellFinder.aiを搭載。画像取得や解析のプロセスに多くの学習済みAIを実装。これにより、設定や最適化の工程数が大幅に削減され、誰もが簡単に結果を得ることができます。



画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE SmartExperiment Basic Set Cytotoxicity

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 生細胞と死細胞の割合を解析できます。
- ✓ ワンクリックでレポートを作成し、画像、解析結果、用量反応曲線、EC₅₀/IC₅₀の算出結果をPDFで出力できます。
- ✓ 細胞イメージングと解析をより簡単に、より快適に