

APPLICATION NOTE

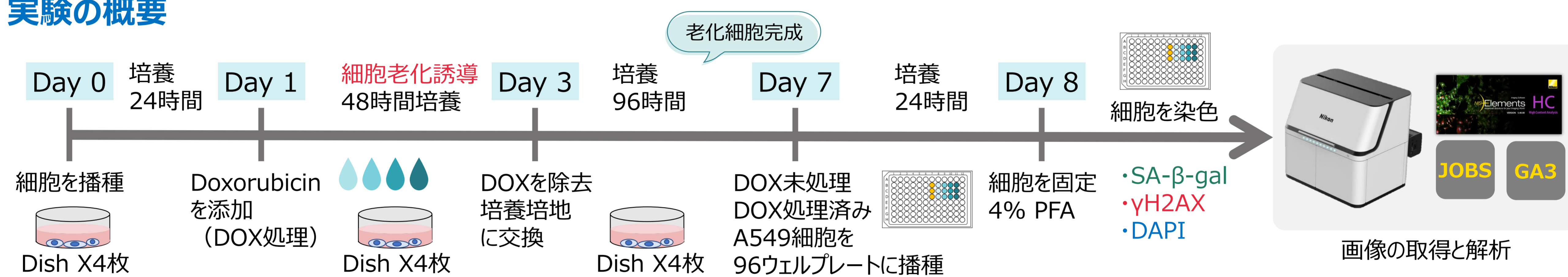
 デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji
 画像統合ソフトウェアNIS-Elements AR
 オプションモジュール NIS-A Bundle JOBS W/HC/RDB/GA3

細胞老化のラベルフリー定量解析と顆粒のハイコンテンツイメージング

多重蛍光染色の実験で蛍光色素の組み合わせや選択に悩んだことはありますか？細胞領域を識別するために細胞質を染色する色素を使用し、実験が制限されたことはありますか？多重染色によるハイコンテンツイメージングは、タンパク質の局在や発現レベル、形態学的変化など、生物学的に意味のある豊富な情報が同時に得られます。一方で、蛍光色素間における蛍光の漏れ込み（クロストーク）が定量解析に影響を及ぼすという課題があります。Volume Contrast (VC)は、明視野画像から蛍光画像のような画像を構築でき、ラベルフリーで細胞領域を識別できます。これにより、クロストークを最小限に抑えた定量解析結果が得られます。高精度な定量解析手法は、わずかな薬効の違いを定量でき、信頼できる高品質なデータを提供します。本アプリケーションノートでは、SA-β-gal（老化マーカー）、γH2AX（DNAダメージ）、DAPIでA549細胞を多重蛍光染色し、VC画像から細胞領域を識別することで細胞老化を定量する例を紹介いたします。

キーワード：細胞老化、SA-β-gal、DNAダメージ、γH2AX、顆粒の解析、創薬、ハイコンテンツイメージング、Volume contrast、EDF

実験の概要



(1) A549細胞 (2x10⁷ cells/dish)を4枚の100mmディッシュに播種し、24時間培養。(2) 被験物質のDoxorubicin (DOX) を 50, 100, 200, 400 nmol/lに調整した培地に交換し、48時間培養。(3) Doxorubicin含有培地を除去して培養培地に交換後、96時間培養。(4) DOX未処理とDOX処理済みのA549細胞 (1x10⁴cells/well)を96ウェルプレートの各3ウェルずつに播種し、24時間培養。(5) 4% PFAで細胞を固定。(6) SA-β-gal (Green) を蛍光プローブで染色。(7) γH2AX (Deep Red)を免疫蛍光染色。(8) DAPIで核を染色。(9) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、NIS-Elements AR (HCA/JOBS) のHCA Fixedテンプレートで画像を取得 (表1)。(10) General Analysis 3で画像解析レシピを作成し、解析データをCSVに出力。(11) Microsoft Excel® でデータを分析。

検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)
細胞の核	DAPI	345/455
SA-β-gal (老化マーカー)	Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER-βGal	500-540/ 530-570
γH2AX (DNAダメージ)	DNA Damage Detection Kit - γH2AX - Deep Red	646/668
細胞領域	None (明視野画像からVC画像を構築)	明視野
倍率		視野 (FOV)
20X		0.88 x 0.88 mm / image
ポイント数		Zスタック
2ポイント/well		1.825μm x 3 steps (Range:3.75μm)

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

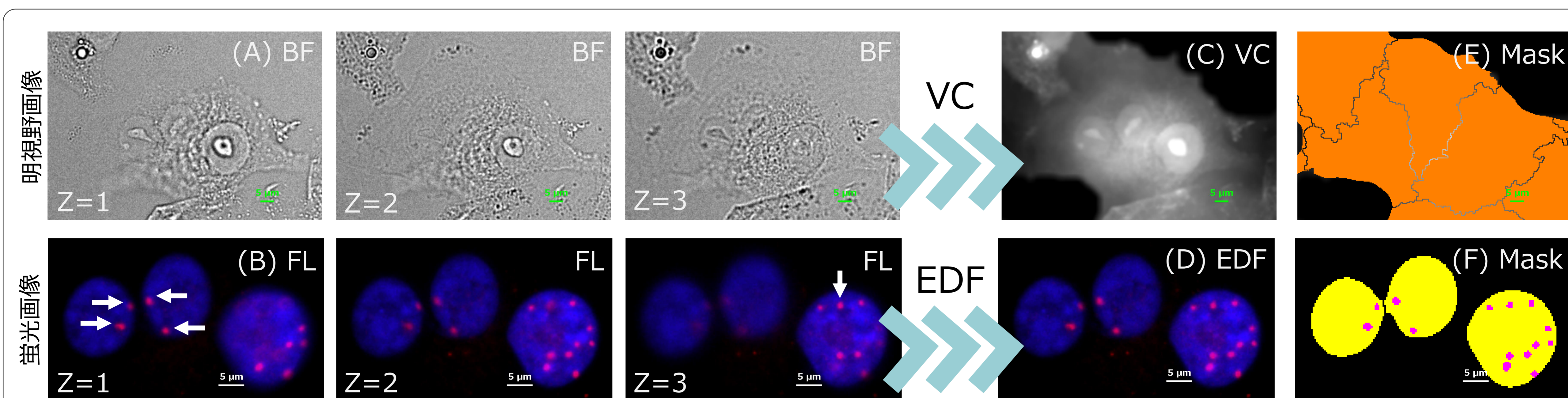


図1. 画像解析の手法、Volume ContrastとEDF画像

(A) 明視野画像、(B) 蛍光画像、(C) Volume Contrast (VC) 画像、(D) Extended Depth of Focus (EDF) 画像、(E) オレンジ：細胞マスク、(F) 黄色：核マスク、マゼンダ：顆粒 (γH2AX) マスク、スケールバー：5μm。VC画像は、焦点面の異なる3枚の明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築できる技術です。これにより、明視野画像からVC画像を構築し、細胞マスク (E) を作成できます。Zスタック画像から1枚のEDF画像 (D) を構築できます。顆粒 (白矢印) は、同じ焦点面に位置していませんが、すべての顆粒に焦点のあった1枚のEDF画像 (D) を生成できます。EDF画像から核マスクと顆粒 (γH2AX)マスク (F) を生成できます。

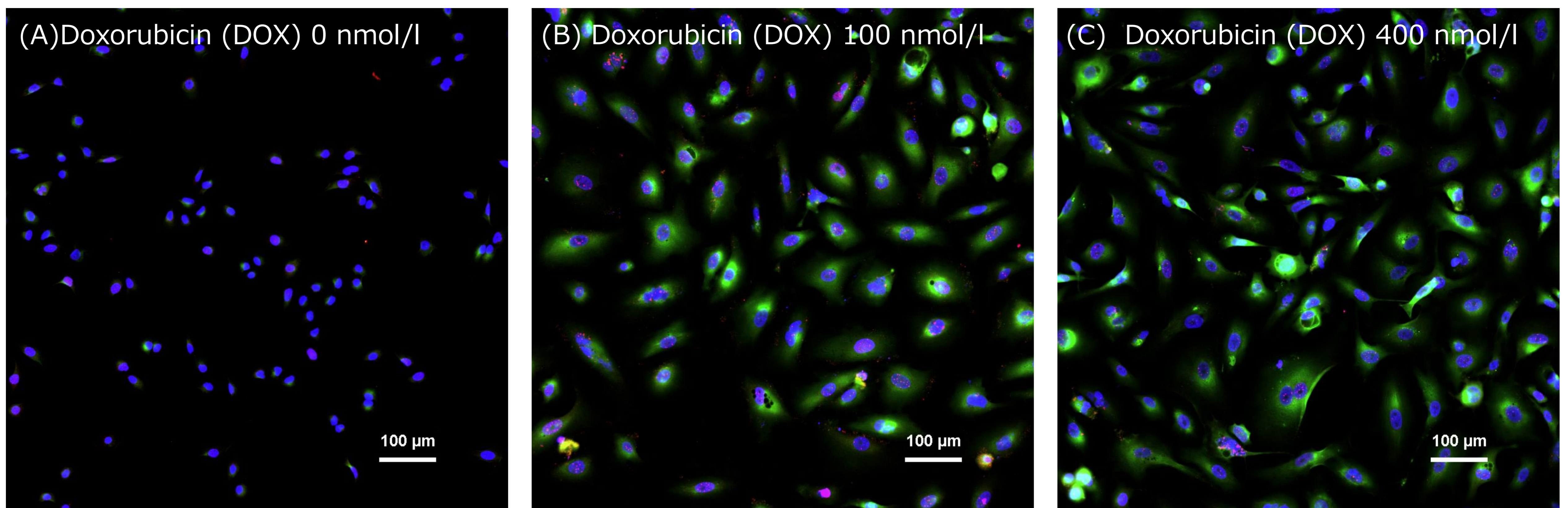


図2. A549細胞の蛍光マージ画像

青：DAPI（核）、緑：SA-β-gal（老化マーカー）、マゼンダ：γH2AX（DNAダメージ）、Doxorubicin (DOX) 処理：(A) 0 nmol/l, (B) 100 nmol/l, (C) 400 nmol/l、スケールバー：100μm。Doxorubicin処理により、SA-β-gal（緑）の蛍光強度が上昇し、細胞の老化が確認された。

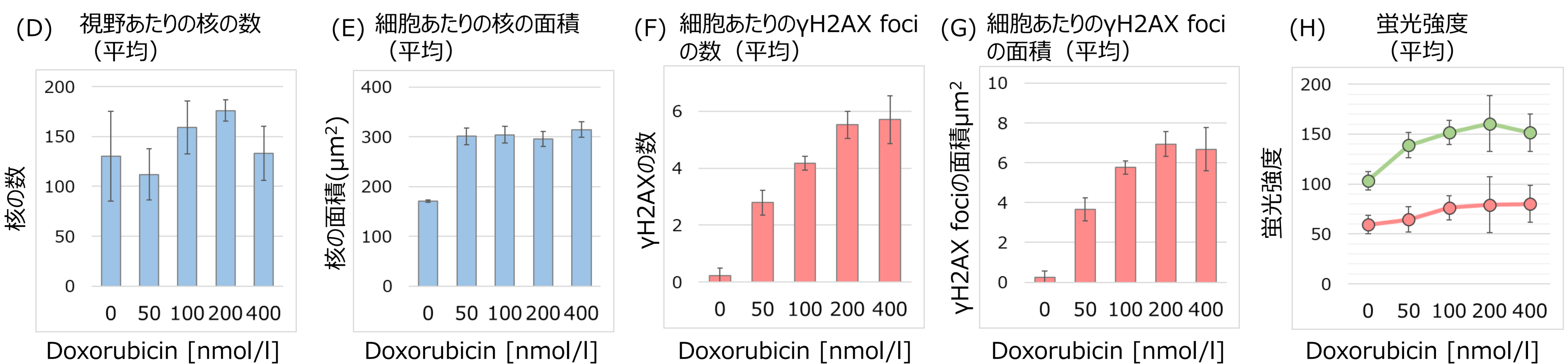
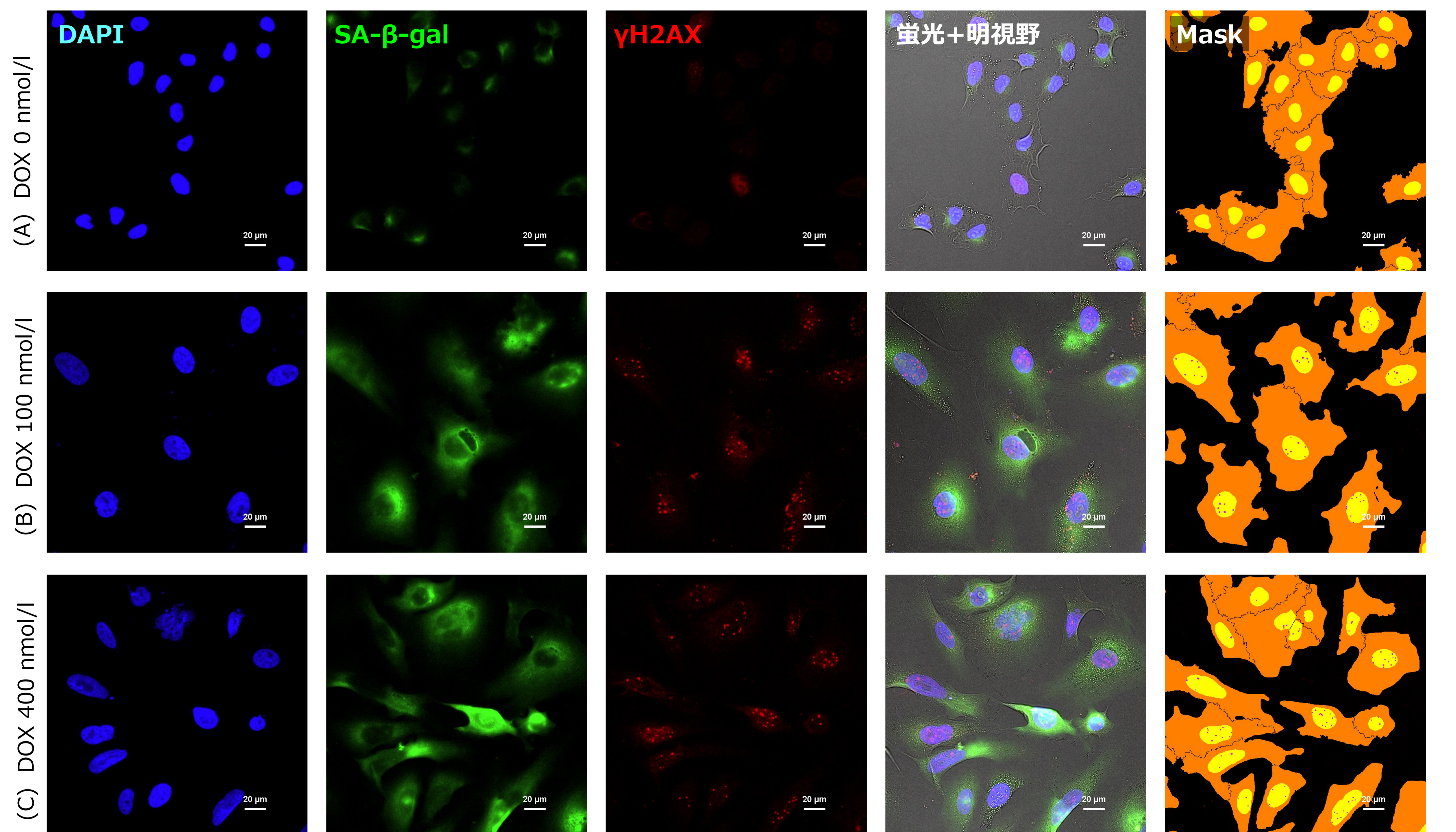
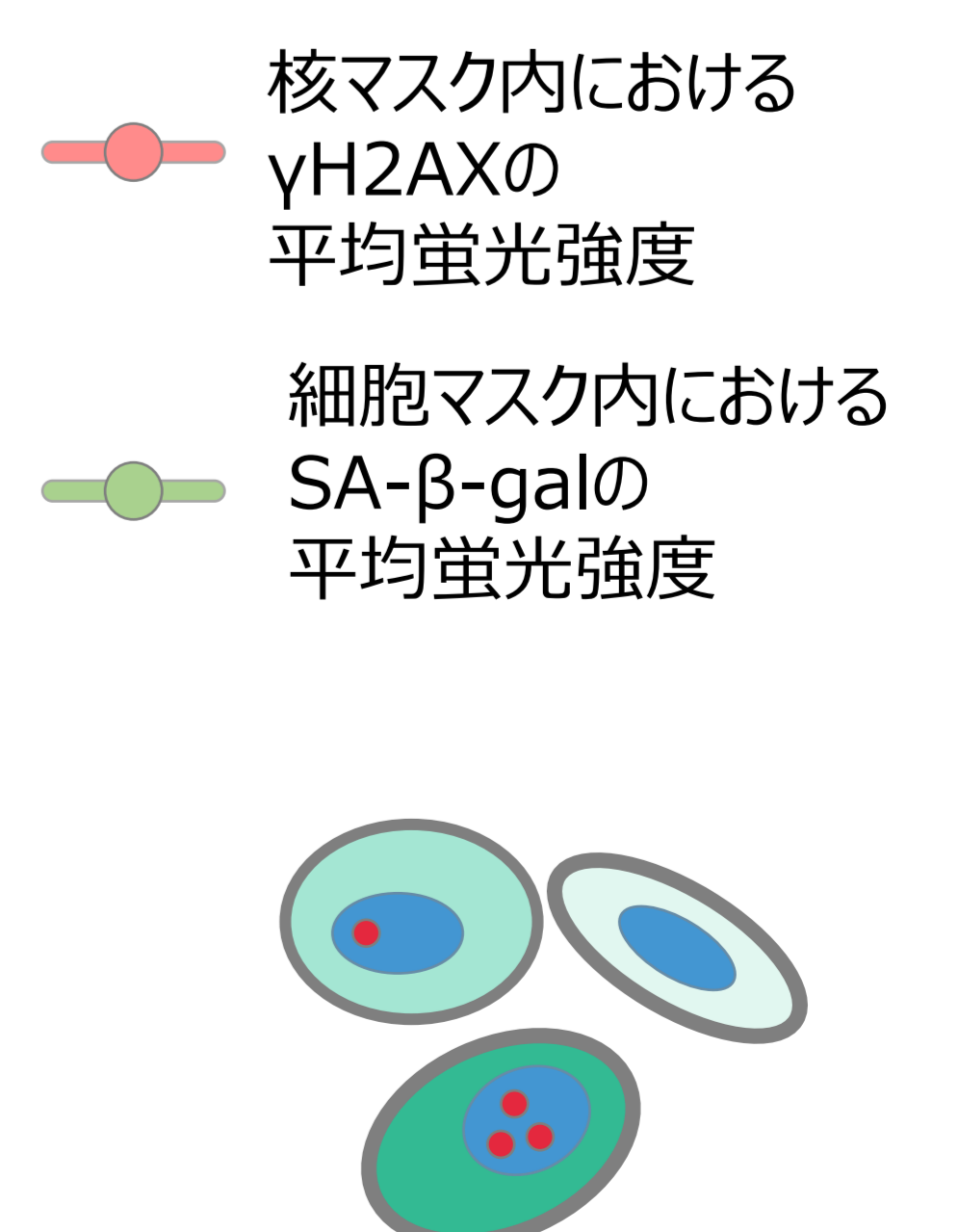


図3. 代表的な画像と解析結果

(A, B, C) 図2の拡大画像、スケールバー：20μm、右側のマスク画像：DAPIで検出した蛍光画像の核領域を二値化して核マスク（黄色）を作成。核マスクの領域における免疫蛍光染色したγH2AX（赤）の顆粒を二値化してγH2AX顆粒マスク（マゼンダ）を作成。明視野画像からVC画像を構築し、VC画像からラベルフリーで細胞マスク（オレンジ）を作成。核の数(D)、核の平均面積(E)、細胞あたりのγH2AXの数(F)、細胞あたりのγH2AX fociの面積(G)、核マスク内におけるγH2AXの平均蛍光強度(H、ピンクの線)、細胞マスク内におけるSA-β-galの平均蛍光強度(H、緑の線)を計測した。核の面積は、Doxorubicin処理により、約1.8倍に肥大した。γH2AXの数と面積は、Doxorubicin 200nmol/l以上の濃度で顕著に増加した。一方、SA-β-gal（老化マーカー）の細胞あたりの平均蛍光強度は、200nmol/lで最大となり、400nmol/lで減少した。これらの結果から、Doxorubicin 200nmol/l以上の濃度において、A549細胞の顕著な細胞老化が確認された。

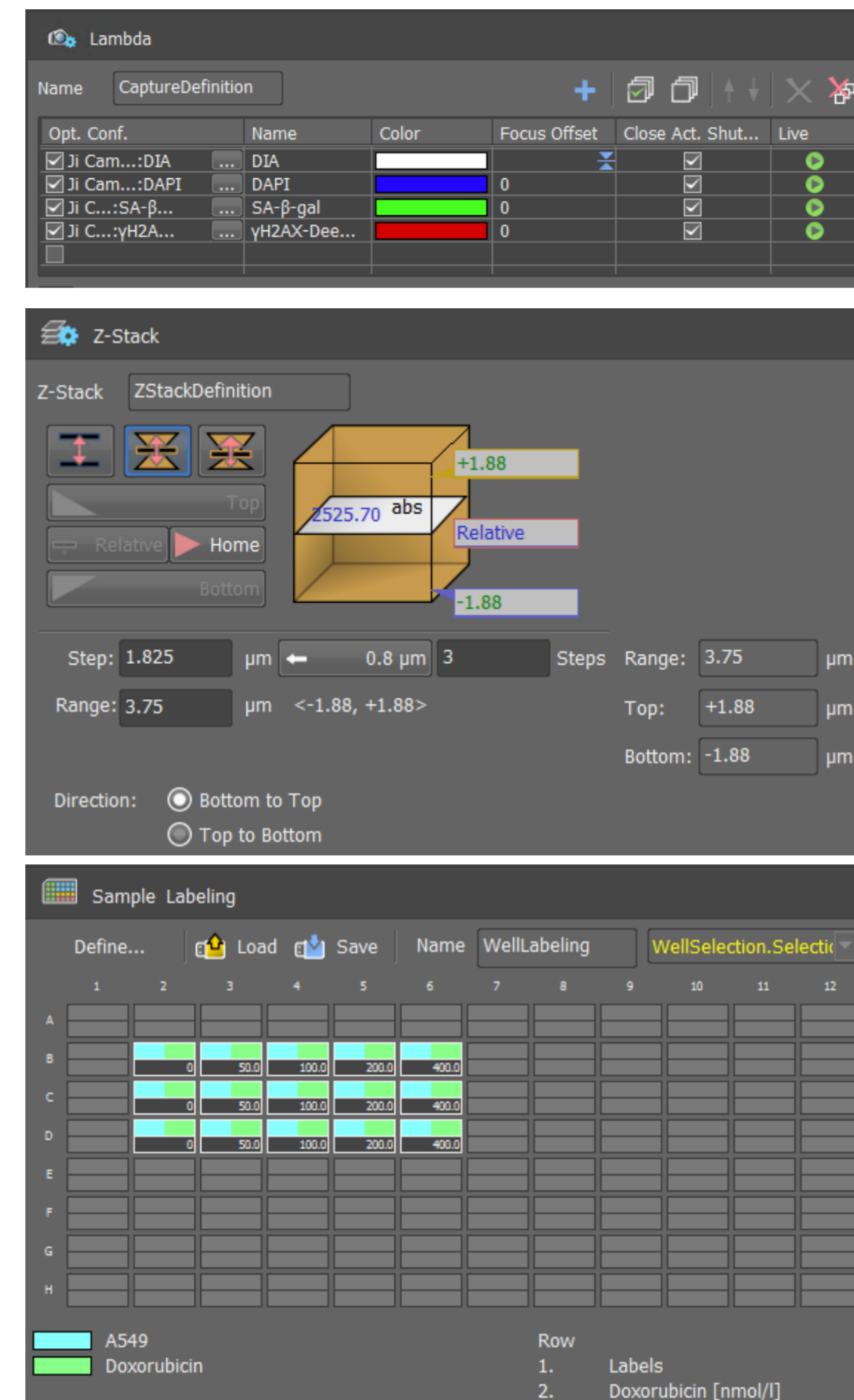
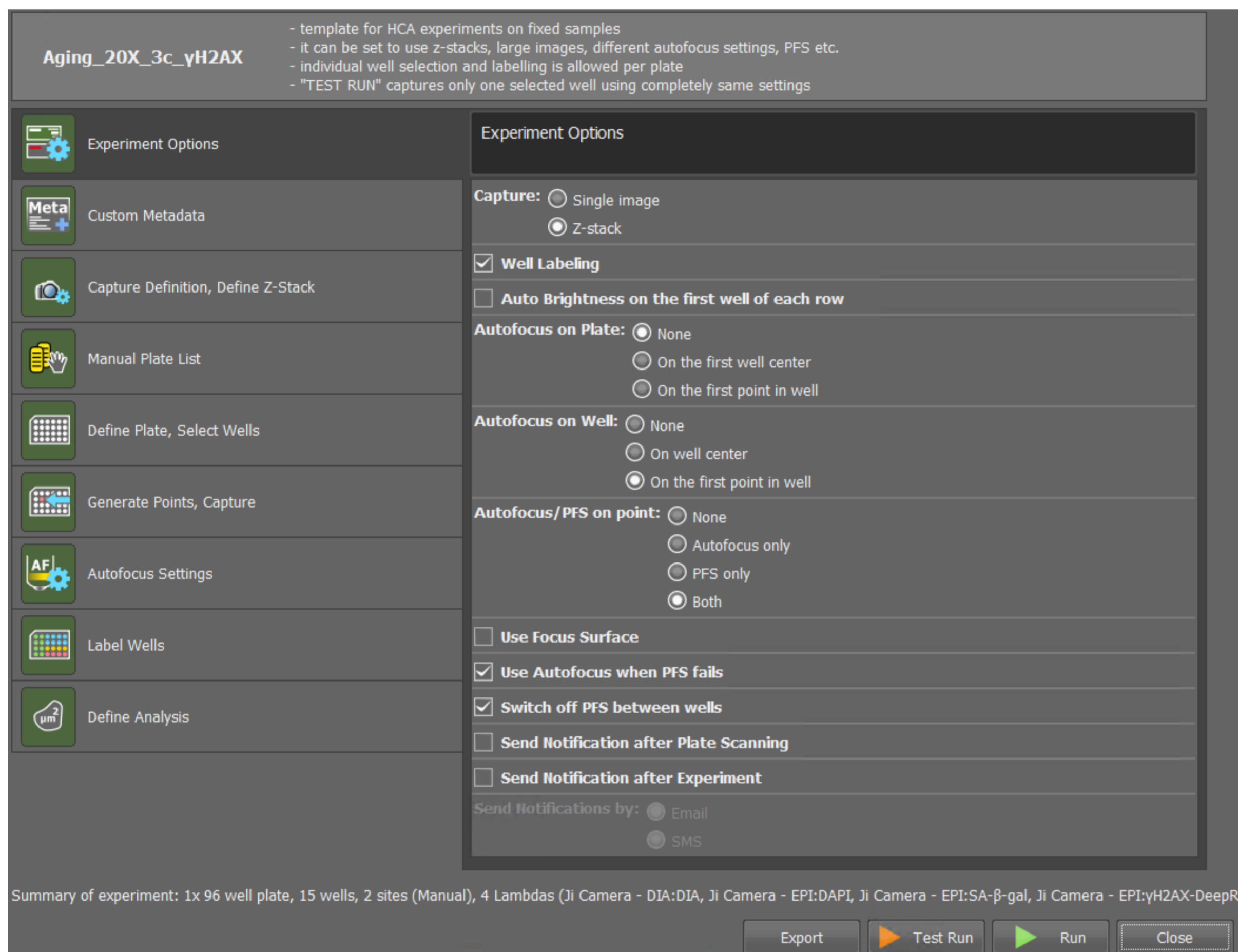


まとめ

- ✓ A549細胞は、Doxorubicinの用量依存的に核の面積と γ H2AXの顆粒の数が増加しました。
- ✓ Doxorubicin処理により、核マスク内における γ H2AXの蛍光強度と細胞マスク内におけるSA- β -galの蛍光強度が増加し、細胞の老化を誘導できました。
- ✓ ハイコンテンツイメージングは、核の肥大や核領域における顆粒の数など、細胞の形態学的変化やタンパク質の局在を検出でき、生物学的洞察を深めます。
- ✓ Volume Contrast画像から蛍光波長を使用せずにラベルフリーで細胞マスクを生成でき、クロストークを最小限に抑えた解析結果が得られました。

- ✓ 同じ焦点面に位置していない微細な顆粒をすべての顆粒に焦点のあった1枚のEDF画像を生成し、高精度な定量解析を実現しました。
- ✓ NIS-Elements HCのウィザード形式による画像取得テンプレートを用いてカスタマイズ性が高い実験であっても容易に画像を取得できました。
- ✓ 今回の実験に用いた蛍光色素は特異性が高く、シグナル強度も強く、信頼できる高品質なデータが得られました。
- ✓ SPiDER- β Galは、生細胞でSA- β -galを染色が可能のため、老化誘導に必要な薬物処理時間の見極めなど、実験条件の最適化にも活用が期待されます。

イメージング機器とソフトウェアの構成



機材の仕様	
倒立顕微鏡	ECLIPSE Ji
モノクロカメラ	Ji内臓カメラ
蛍光光源	D-LEDI2
蛍光フィルターキューブ	C-FL-Q Quad band FL filter Cube 378/474/554/635
対物レンズ	CFI Plan Apochromat Lambda D 20X
ソフトウェアの仕様	
ソフトウェア	NIS-Elements AR
オプションモジュール	Bundle JOBS W/HC/RDB/GA3 Volume Contrast EDF module NIS.ai 6D

図4. NIS-Elements AR (HCA/JOBS) のHCA Fixed画像取得テンプレート

NIS-Elements ARのHCA/JOBSは、ウィザード形式の画像取得テンプレートにより、撮影条件の設定をナビゲートします。自由度が高く、かつ容易に画像を取得できます。また、画像の取得から解析まで、シームレスなワークフローにより、実験を効率化できます。

材料と試薬

細胞培養																																																																																																																						
細胞	A549細胞																																																																																																																					
増殖培地	DMEM																																																																																																																					
培養容器	1) SANPLATEC CORP #26502, NEST 100 mm Dish for Cell Culture 2) Ibidi #89626, μ -Plate 96 Well Square																																																																																																																					
被験物質																																																																																																																						
化合物	Doxorubicin																																																																																																																					
試験濃度	0, 50, 100, 200, 400 nmol/l																																																																																																																					
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></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td> <td>0</td> <td>50</td> <td>100</td> <td>200</td> <td>400</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td> <td>0</td> <td>50</td> <td>100</td> <td>200</td> <td>400</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td> <td>0</td> <td>50</td> <td>100</td> <td>200</td> <td>400</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <th>H</th> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A													B		0	50	100	200	400							C		0	50	100	200	400							D		0	50	100	200	400							E													F													G													H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A																																																																																																																						
B		0	50	100	200	400																																																																																																																
C		0	50	100	200	400																																																																																																																
D		0	50	100	200	400																																																																																																																
E																																																																																																																						
F																																																																																																																						
G																																																																																																																						
H																																																																																																																						

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
-Cellstain®- DAPI solution	D523	(株) 同仁化学研究所
Cellular Senescence Detection Kit - SPiDER- β Gal	SG03	(株) 同仁化学研究所
DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Deep Red	G267	(株) 同仁化学研究所

細胞染色プロトコル

■ SA- β -gal染色

- 1) 細胞の培養上清を除き、4%PFA溶液（100 μ l/well）を各ウェルに添加し、室温で3分間インキュベートする。
- 2) PFA溶液を除去し、PBS(100 μ l/well)で細胞を3回洗浄する。
- 3) SPiDER- β Gal working solution (100 μ l/well)をウェルに添加し、37°Cで30分間インキュベートする。* SG03取り扱い説明書の「固定化細胞を用いたアッセイ」参照。
<https://www.dojindo.co.jp/manual/SG03/>
- 4) インキュベート後、PBS（100 μ l/well)で細胞を2回洗浄する。

細胞染色プロトコル

- DNA Damage Detection Kit - γ H2AX - Deep Red
- * 取り扱い説明書の方法とは少し異なります。
- 1) SA- β -gal染色の操作後、0.1% Triton X-100/PBS溶液 (100 μ l/well)を添加し、室温で30分間インキュベートする。
- 2) 上清を除去し、PBS(100 μ l/well)で細胞を2回洗浄する。
- 3) Blocking Solution (100 μ l/well)を添加し、室温で20分間インキュベートする。
- 4) 上清を除去し、PBS(100 μ l/well)で細胞を2回洗浄する。
- 5) γ H2AX staining solution (100 μ l/well)を添加し、4度で一晩インキュベートする。
- 6) 上清を除去し、PBS(100 μ l/well)で細胞を2回洗浄する。
- 7) Secondary antibody staining solution (100 μ l/well)を添加し、室温で1時間インキュベートする。
- 8) 上清を除去し、PBS(100 μ l/well)で細胞を2回洗浄する。

謝辞

サンプル提供：株式会社 同仁化学研究所
老化誘導の実験条件およびイメージングに最適化させた染色条件プロトコル確立にご協力をいただいた、株式会社 同仁化学研究所の皆様にご心より感謝します。

製品情報

デジタル倒立顕微鏡 ECLIPSE Ji

ECLIPSE Jiは、NIS-Elements AR と組み合わせて使用することで、自由度の高い実験を可能にします。要望に合わせて柔軟にカスタマイズできるため、個々のニーズに合わせて実験を最適化できます。

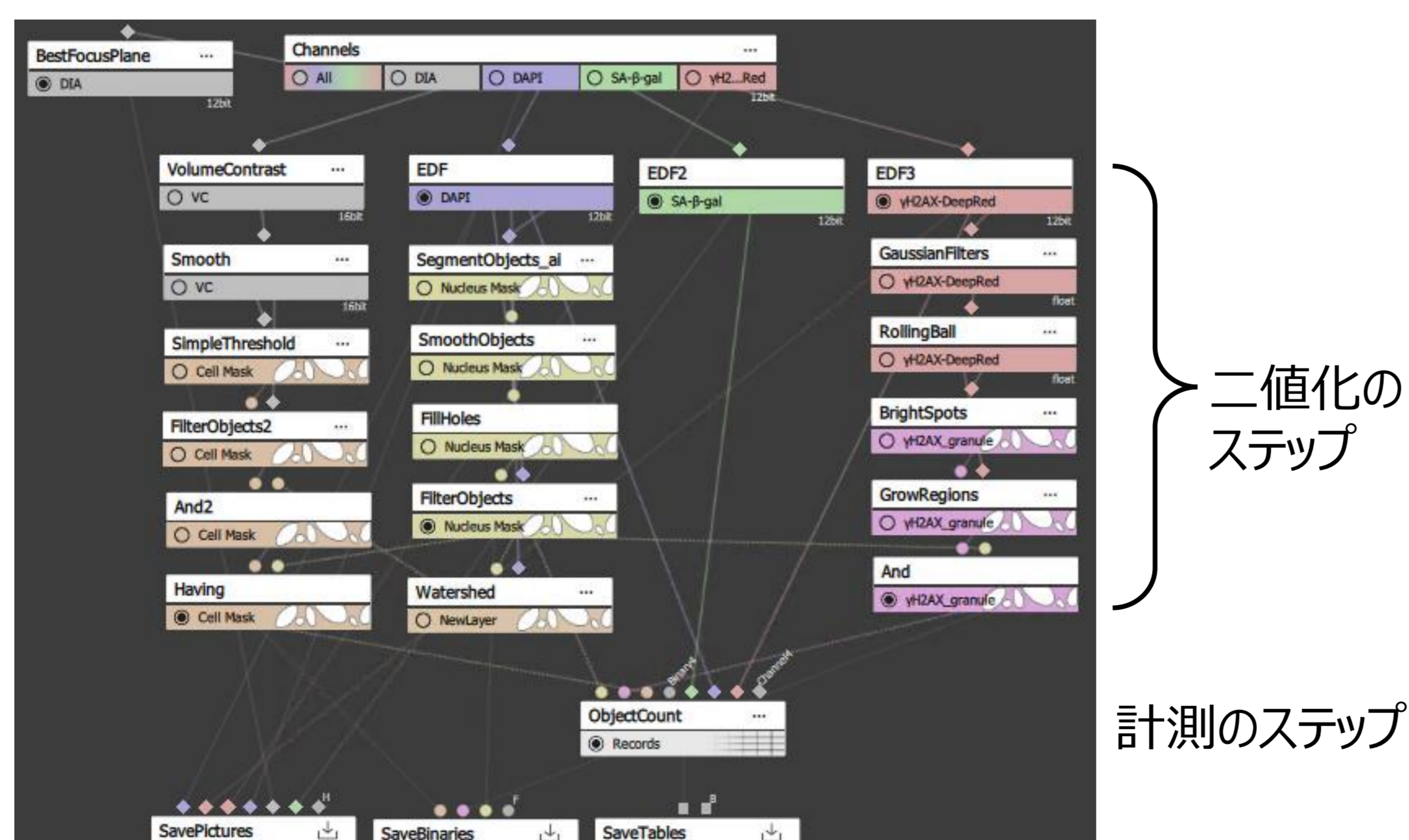


画像統合ソフトウェアNIS-Elements AR

NIS-Elements ARのHCA/JOBS (Bundle JOBS)は、ハイコンテントイメージングのためのトータルソリューションを提供します。画像の取得から解析まで、シームレスなワークフローにより、実験を効率化できます。

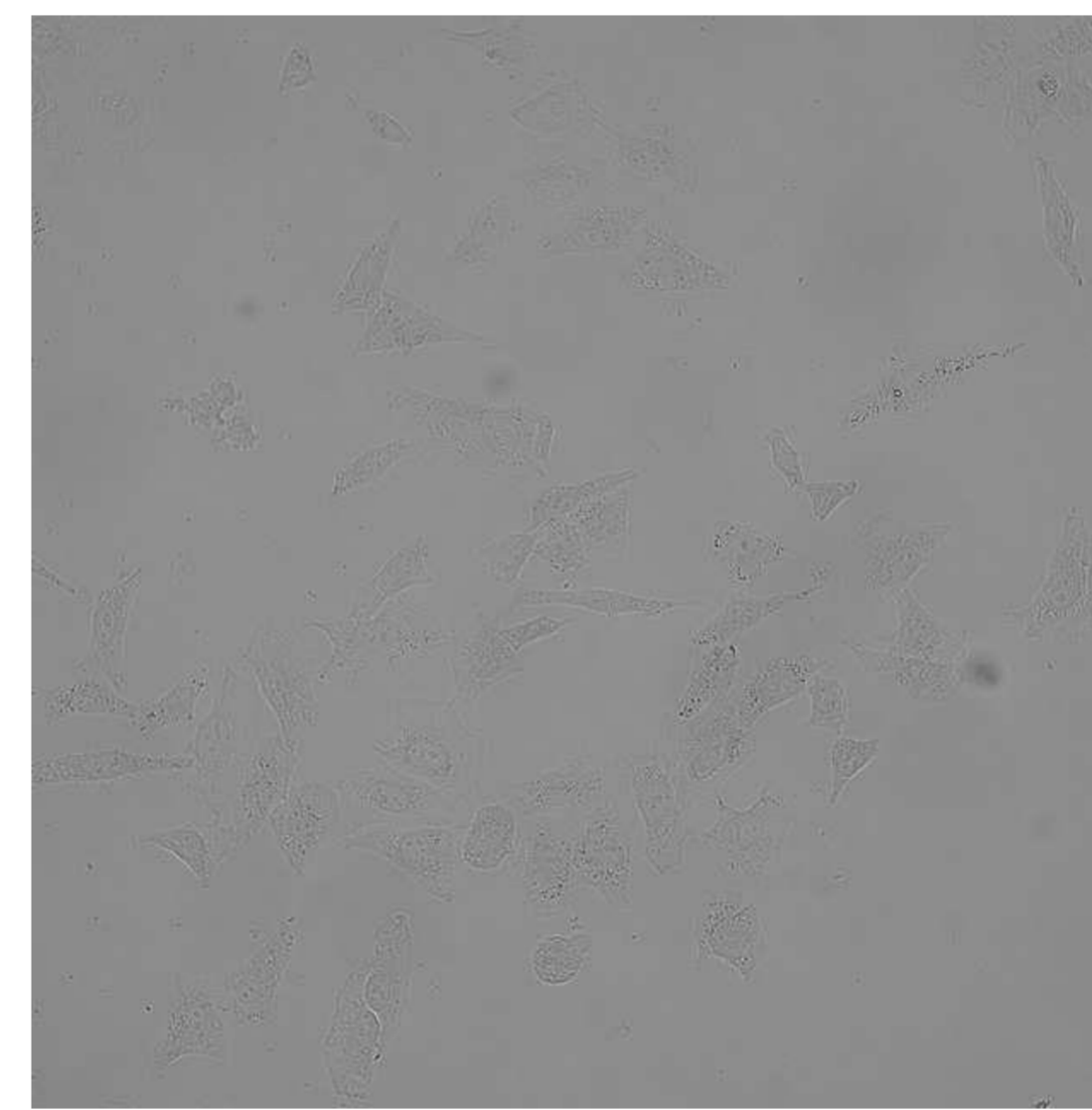
画像解析ソフトウェアモジュール General Analysis 3

解析ブロックを組み合わせるだけで、簡単に細胞領域の二値化や計測が行え、目的に応じて柔軟に画像解析が実施できます。

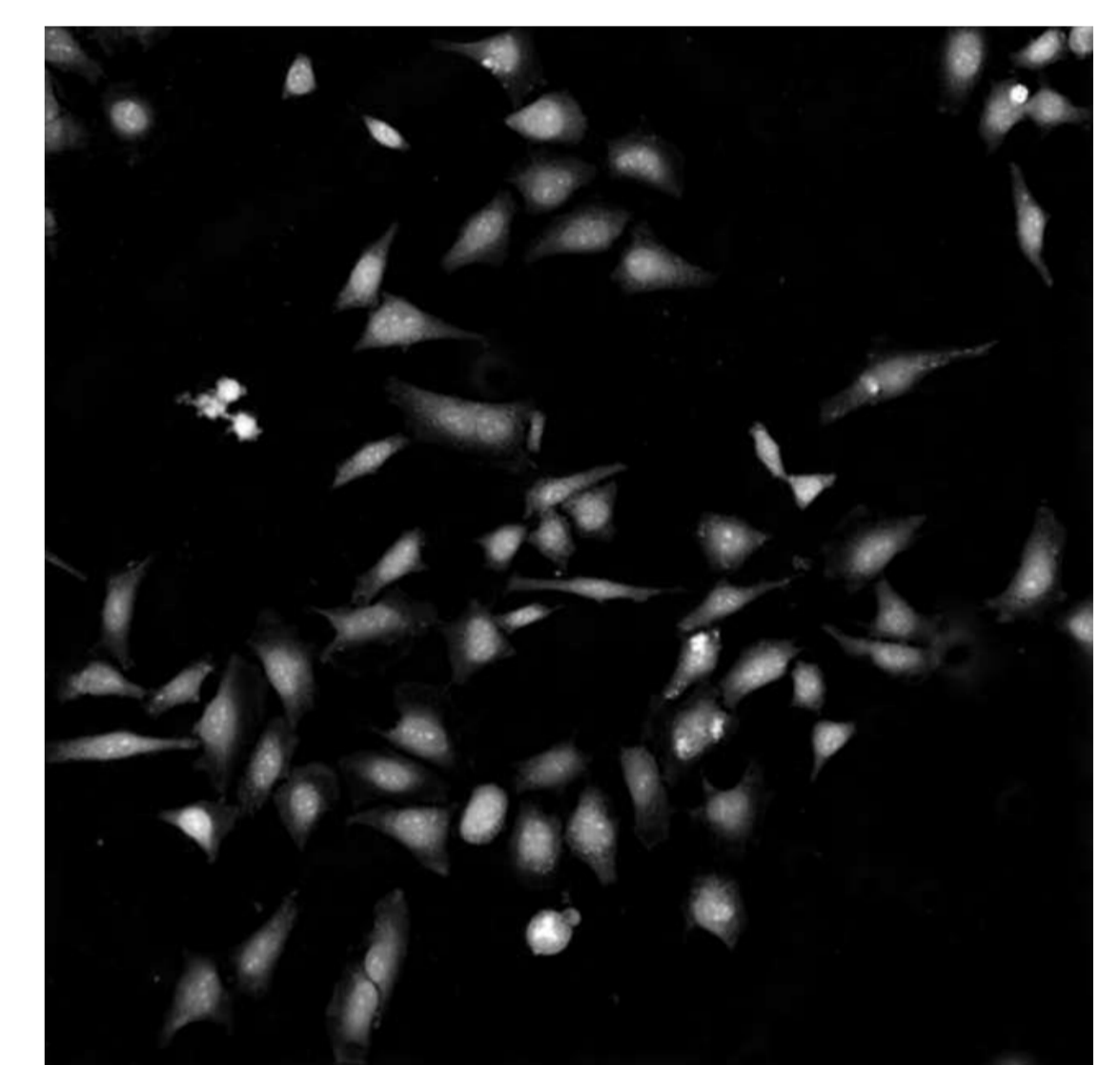


Volume Contrast (VC)

複数のZ深度で撮影した明視野画像から蛍光画像のような位相分布画像を構築可能な、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのアドオンモジュールです。特別な光学アクセサリの追加は不要で、手軽にラベルフリーでの定量解析が行えます。



明視野画像



Volume Contrast画像

Extended Depth of Focus (EDF)

複数のZ深度で撮影した画像から全ての領域でフォーカスがあった1枚のEDF画像を構築できます。

被写界深度が浅く、小さな構造物が同じ焦点面に位置していない画像の定量解析に有効な技術です。

NIS.ai (SegmentObject.ai)

SegmentObject.aiは、従来の二値化や画像処理では抽出が困難だったターゲットに対する分類を、ニューラルネットワークに学習させることができます。また、事前学習済みのモデル*1がいくつか搭載されており、今回の実験に使用したECLIPSE Jiの内蔵カメラと λ D20倍対物レンズで取得したDAPIの蛍光画像においては、事前学習済みのモデルで精度の高いセグメンテーションが可能でした。

*1 NIS-Elements v6.01以降

