



Cell Analysisモジュール

「間葉系幹細胞カウント」を用いた
間葉系幹細胞の計測

< BioStudio-T 使用例 >

血清のロットチェックや培養条件の検討、薬剤添加の効果など細胞増殖を経時的に評価するには、マルチウェルに播種した細胞の「剥離」「カウント」「増殖カーブの作成と確認」を数日間にわたって毎日同じ時間に行う必要があります。多くの時間と手間を要します。また、細胞や血清・培地など貴重な資源を大量に消費します。さらに「剥離」「カウント」などの操作は作業者間で差が生じやすく均一な播種には熟練した技術を必要とすること、細胞懸濁液の細胞数を計測して調整しても実際に播種する細胞数との誤差が避けられないことなどにより、精度の確保が困難です。

画像解析ソフトウェアNIS-ElementsとCell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」を組み合わせることで、培養中の間葉系幹細胞 (MSC) の位相差画像から細胞数の計測が行えます。

インキュベータ内に設置したBioStudio-TにMSCを播種したプレートを置き、数日間にわたって経時的に取得した位相差画像から、Cell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」を用いて細胞数カウントを行いました。

観察装置

- BioStudio-T (BS-T04A) (Nikon, MLA20000)

画像解析ソフトウェア

- NIS-Elements AR ver. 5.30.02 (Nikon, MQS31000)
- NIS-A General Analysis (Nikon, MQS43110)
- NIS-A Upgrade to GA3 (Nikon, MQS43150)

Cell Analysisモジュール

- 間葉系幹細胞カウント PC-CO-01 (Nikon, MQS60000)

細胞

- 骨髄由来間葉系幹細胞hTERT, HPV E7導入 不死化細胞株UE7T-13 (JCRB1154, JCRB細胞バンク)⁽¹⁾

試薬及び材料

- Gibco™ DMEM, low glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, 11885084; With Low Glucose, L-Glutamine, Sodium Pyruvate, without HEPES)
- Gibco™ Fetal Bovine Serum, mesenchymal stem cell-qualified, USDA-approved regions (Thermo Fisher Scientific, 12662029)
- Gibco™ PBS(-), pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)
- TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red (Thermo Fisher Scientific, 12563011)

- StemSure® 0.1w/v%ゼラチン溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社, 190-15805)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

方法

UE7T-13細胞を6ウェルプレートの各ウェルに、 1.0×10^4 、 2.0×10^4 、 4.0×10^4 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。CO₂インキュベータに4倍モデルBioStudio-Tを設置し、37°C、5% CO₂、加湿した状態にて培養しました。ウェル中心部9×12視野の位相差画像を撮影しました。撮影条件は各ウェル中心部においてマニュアルで調整したZ位置をグリッドメニューにデータセットし、image AF設定をonにしてタイムラプス撮影をおこないました。撮影したタイリング画像はタイムラプス画像としてNIS-Elementsに取り込み、メニスカスの影響のない領域 (約16 mm × 14 mm) を切り取りました。そして、Cell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」を用いて解析し、細胞数を測定しました。得られた測定値をグラフ化し、細胞増殖を確認しました。

結果

6日間培養し撮影した位相差画像のメニスカスの影響のない領域(約16 mm × 14 mm)を切り取り、Cell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」にて解析しました。その画像の一部を図1に示しました。各細胞を認識していることが確認できます。NIS-Elementsにより自動計測された細胞数から増殖カーブを作成し図2に示しました。

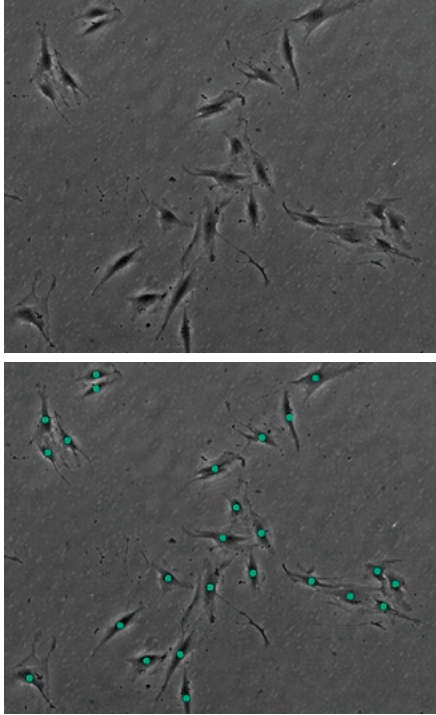


図1. UE7T-13細胞の位相差画像とマスク画像

(上)UE7T-13細胞を 2.0×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、播種4時間後に取得した位相差画像の一部です。(下)上記画像にNIS-ElementsのCell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」を適用した画像です。

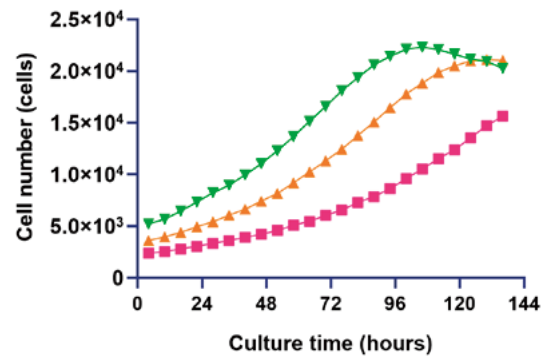


図2. UE7T-13細胞の増殖カーブ

UE7T-13細胞を 1.0×10^4 (マゼンタ)、 2.0×10^4 (橙)、 4.0×10^4 (緑)細胞/ウェルの密度で播種し、撮影した画像中のメニスカスの影響を受けない領域(約16 mm × 14 mm)にCell Analysisモジュール「間葉系幹細胞カウント」を適用し、細胞数を数値化しました。

まとめ

- UE7T-13細胞の培養過程の位相差画像をNIS-Elementsで解析することにより、細胞を剥離・分散することなく、細胞数の算出が可能であることが示されました。
- 得られた計測数値はcsv形式で出力され、TIBCO Spotfire®やMicrosoft Excel®等のソフトウェアでグラフを作成することが可能です。
- 非侵襲的に評価をするため、評価に使用したサンプルは無駄なくそのまま別の実験に使用することが可能です。
- 培養しながら細胞数の確認が可能のため、解析結果から継代するタイミングを決定したり、細胞を適切なタイミングで実験に使用したりすることが可能です。

参考文献

1. Taisuke Mori et al., Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential, *Mol Cell Biol.*, 25(12): 5183-5195, 2005.

<観察装置のご紹介>

インキュベータ内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と、ステージを動かさずにスクリーニング可能なBioStudio-T。いずれも細胞に与えるストレスを抑え、試料内の複数の地点において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装置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



BioStudio-T



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)
<https://www.healthcare.nikon.com/ja/>

(株)ニコンは、環境マネジメントシステムISO14001の認証取得企業です。

株式会社 **ニコン ソリューションズ**

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/

本社 140-0015 東京都品川区西大井1-6-3 (株)ニコン 大井ウエストビル3階

東京 (03) 3773-8138 名古屋 (052) 709-6851 京都 (075) 781-1170
札幌 (011) 281-2535 金沢 (076) 233-2177 岡山 (086) 801-5055
仙台 (022) 263-5855 大阪 (06) 6394-8801 福岡 (092) 558-3601



拠点一覧