

不織布培養基材上の細胞の共焦点3Dイメージングと解析

近年、再生医療やバイオ医薬品の進歩に伴い細胞を高品質かつ大量に培養する技術に注目が集まっている。不織布培養基材は、多孔質構造と複雑な3次元構造を有し、生体内で細胞増殖する際の足場として立体的に似た構造のため、2次元培養と比較して大量で高品質な培養が可能であることから需要が高まっている。しかし、繊維の不透明性や立体性により不織布上の細胞の増殖状態や形態を顕微鏡で観察することが難しいという課題がある。

本アプリケーションノートでは、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて不織布の繊維からの反射光および染色細胞からの蛍光を検出し、3D構築することで、繊維上での細胞の増殖や接着状態を立体的に可視化した事例を紹介する。画像統合ソフトウェアNIS-ElementsのGA3画像解析モジュールを用いることで、3D画像から不織布上や間隙の細胞数、細胞形態等の特徴量を空間的に定量解析することも可能である。

キーワード：共焦点顕微鏡、創薬、再生医療、不織布培養基材、MSC、3D培養、3D解析

実験の概要

1.細胞培養

帝人フロンティア株式会社のecellbaを用いて、間葉系幹細胞(MSC)を 4.0×10^4 cells/mLで播種し、8日間培養した。培養装置から不織布を抜き取り、Hoechst33342とCalcein-AMで染色後、固定し、サンプルを作製した。

2.画像取得

倒立顕微鏡Ti2-E、10xPlanApoλD対物レンズ、DS-Qi2カメラを用いて明視野像と蛍光像を取得した(A,B)。透過照明光を用いて明視野像を取得、さらに同一視野の蛍光像をHoechst33342を365nm、Calcein-AMを488nmの励起光を用いて検出した。その結果、繊維の間隙に存在する細胞を観察できた。

さらに細胞の形態や接着状態を評価するため、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX R、10xPlanApoλD対物レンズを用いて精細な蛍光像の取得を試みた。Hoechst33342を405nm、Calcein-AMを488nmの励起光を用いて取得し、繊維の反射光は640nmの照明光を照射し、632-750nmの範囲の波長を検出するようにディテクターを設定して取得した(C)。また、Zスタックを2.2μmごとに102枚撮影することで、3D画像を構築し、不織布と細胞の接着や増殖状態を立体的に観察した(D-F)。その結果、細胞が繊維に接着して伸長している様子や、細胞が繊維の間隙を埋めるように増殖している様子が観察できた。

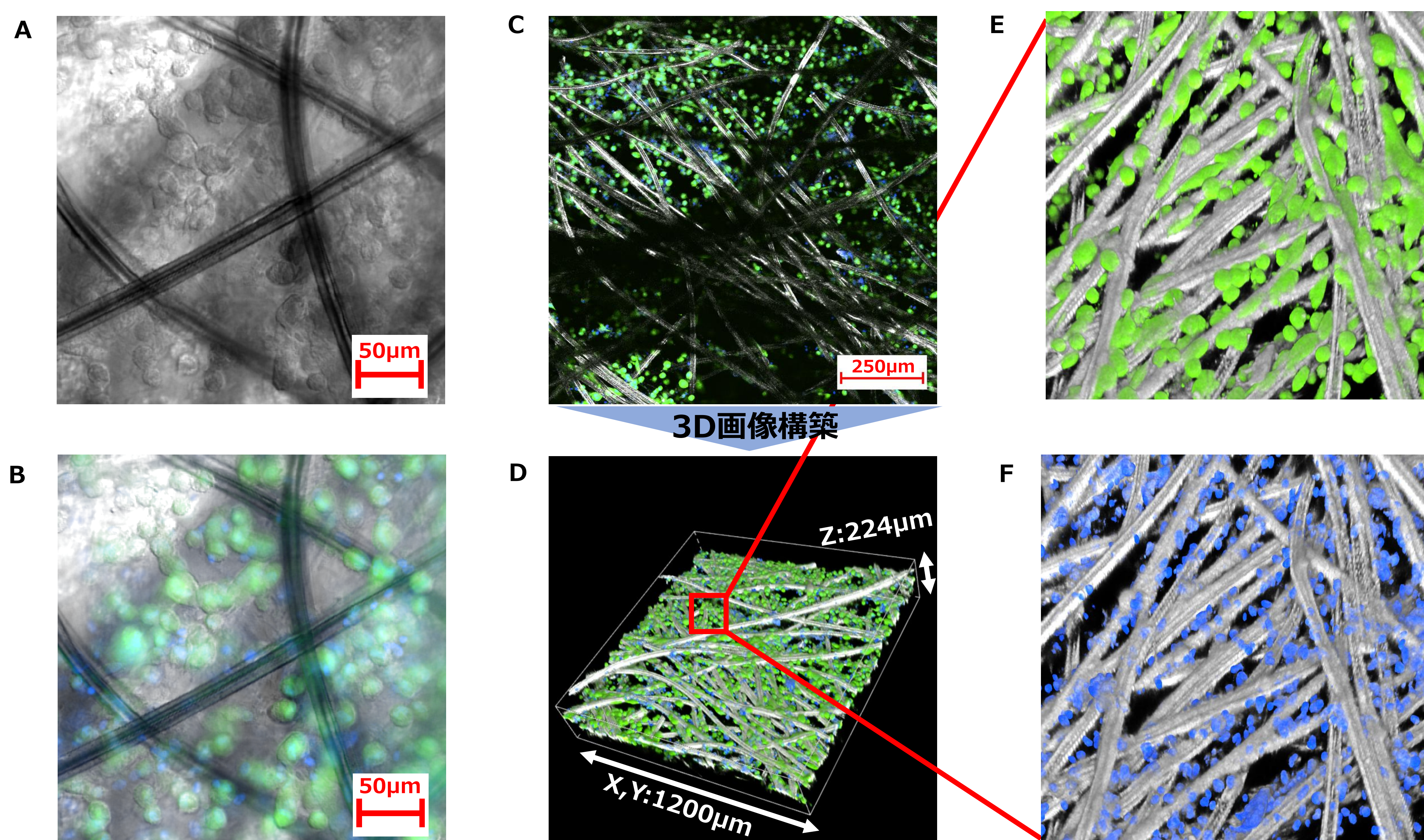


図1. 不織布に播種されたMSCの3Dイメージング

A,B 倒立顕微鏡Ti2で明視野像(A)と蛍光像(B)を取得。青：Hoechst33342(細胞核)、緑：Calcein-AM(細胞質)。
C,D,E,F 共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて明視野像と蛍光像を取得した(C)。Zスタック像から画像を3D構築した(D)。3D画像の一部をズームアップし、同一視野の不織布の繊維像とCalcein-AMまたはHoechst33342蛍光像を重ね合わせた(E,F)。青：Hoechst33342(細胞核)、緑：Calcein-AM(細胞質)、白：640nmで励起させた時の不織布の繊維からの反射光。スキャナー：ガルバノ、アベレーシング：8x、解像度：1.73 μ m/pixel、Zステップ：2.2 μ m毎に102枚撮影、対物レンズ：10x Plan Apo λ D NA0.45。



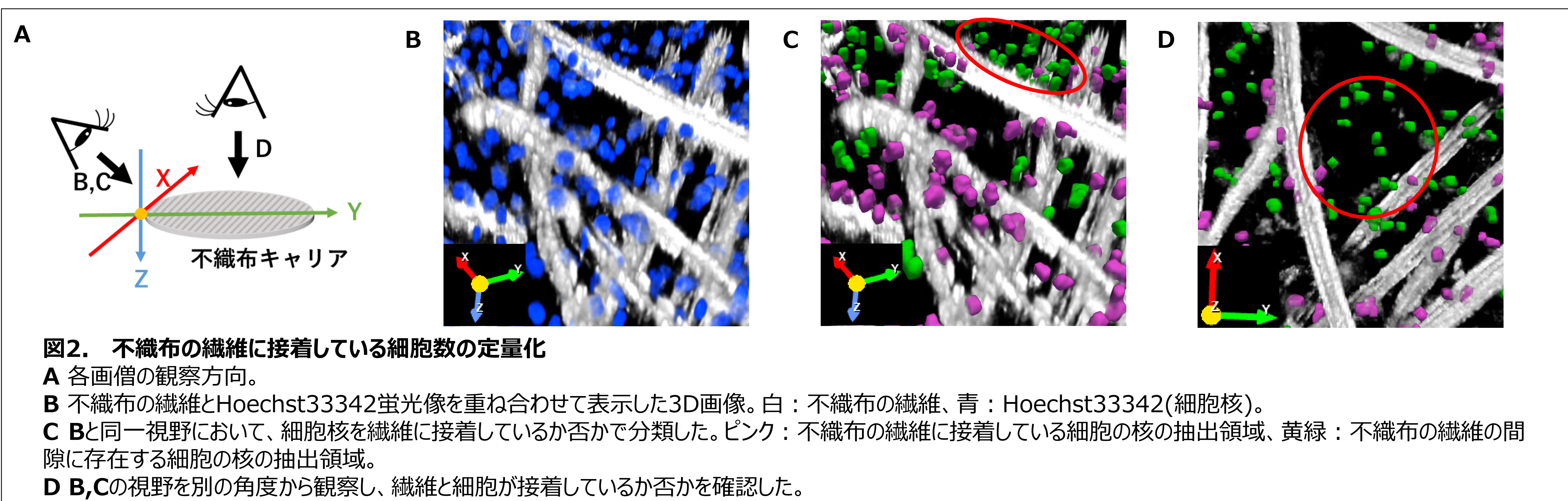
動画は[こちら](#)

General Analysis 3(GA3)を用いた解析例

画像統合ソフトウェアNIS-Elementsの画像処理・計測モジュールであるGeneral Analysis 3(GA3)を用いて、不織布培養基材に増殖した細胞の3D解析を行った。3D解析は不織布の繊維表面の細胞接着や細胞形態を立体的に評価できるため、より正確な定量化を可能にした。その一例を以下に示す。

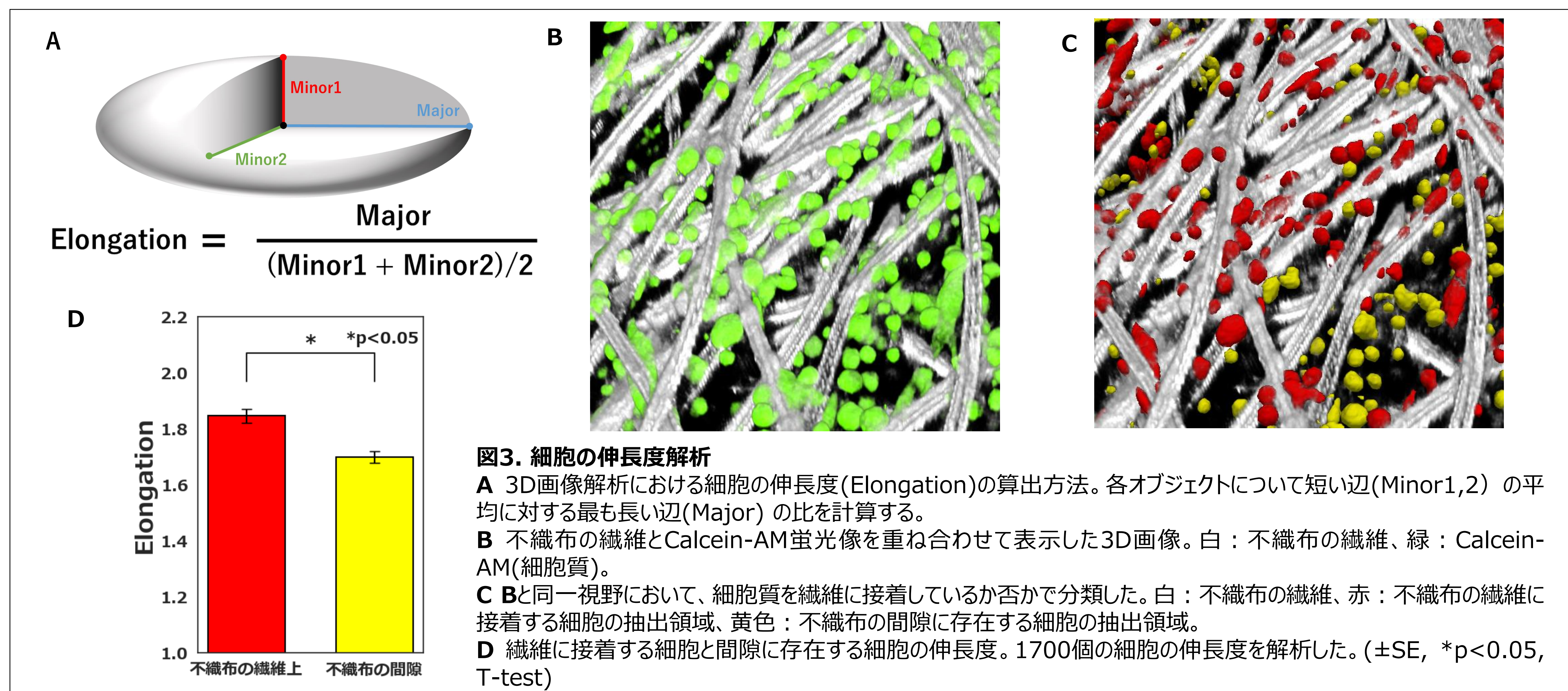
(1)不織布の繊維に接着している細胞数の定量化

3D画像の観察により、不織布の繊維表面に接着する細胞と不織布の間隙を埋めるように増殖する細胞が存在することが分かったため、これらの細胞の割合を解析した。Calcein-AM、Hoechst33342蛍光像から細胞質領域または、細胞核領域を、反射像から繊維領域を抽出した。抽出した細胞質領域を繊維領域と重複しているか否かで2グループに分類し、それぞれの細胞質領域に重複する細胞核の数をカウントした。繊維に接着している細胞の割合を計算した結果、74%の細胞が繊維に接着して存在することが分かった。



(2)細胞形態の定量化

不織布の繊維に接着している細胞と不織布の間隙を埋めるように増殖する細胞との間に形態の違いが見られたため、定量化解析を行った。Calcein-AM蛍光像からそれぞれの細胞の細胞質領域を抽出し、伸長度を算出することで、形態の違いを計測した。3D画像の伸長度は、オブジェクトの重心からXYZ軸方向の長さを算出し、短い2辺の平均値に対する長辺の比を算出するパラメーターである。XYZ軸の長さの平均値が等しい場合は、球に近い形状であることを意味する。伸長度解析の結果、不織布に接着する細胞の方が伸長度が有意に大きいことが分かった。



まとめ

不織布培養基材に播種されたMSCを共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて撮像し、NIS-Elementsにより3D画像を構築した。3D画像解析の結果、不織布の繊維で細胞が増殖する様子を立体的な情報として得ることができ、より正確に繊維との接着の様子やその細胞形態の違いを解析することができた。

謝辞

サンプルの作製・提供など多大なご協力を頂いた帝人フロンティア株式会社短繊維素材第二部山田巖浩様、千原拓末様に深く感謝いたします。

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート

- ・ **高速：**
最速毎秒720フレーム（レゾナント 2048 × 16画素）
- ・ **高解像度：**
最高 8 K（ガルバノ） / 2 K（レゾナント）
- ・ **高スループット：**
視野数25 mmの超広視野

