



Cell Analysisモジュール 「細胞占有面積率」を用いた HepG2 細胞の増殖評価

< BioStation CT 使用例 >

はじめに

- Cell Analysisモジュール「細胞占有面積率」は、画像解析ソフトウェアNIS-Elementsと組み合わせて使用することにより、これまで目視により判断していた細胞占有面積率を客観的かつ定量的に計測することができるため、判断基準を標準化する上で役立ちます。
- HepG2細胞はヒトの肝臓のモデル細胞として薬物の毒性評価や代謝試験に汎用されている細胞です。再現性の良い試験結果を得るためには適切な細胞占有面積率での継代や評価を行うことが重要です。Cell Analysisモジュール「細胞占有面積率」は、適切な継代やアッセイのタイミングの決定をサポートします。

観察装置

- BioStation CT (Nikon, MLA10000)

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)

画像変換ソフトウェア

- ND2 Generator for BS-CT (Nikon)

Cell Analysisモジュール

- 細胞占有面積率 PC-AR-01 (Nikon, MQS60001)

細胞

- ヒト肝癌由来細胞株HepG2 (JCRB細胞バンク, JCRB1054)⁽¹⁾

試薬及び材料

- DMEM, low glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific, 11885084)
- Fetal Bovine Serum, certified, United States (Thermo Fisher Scientific, 16000044)
- PBS(-), pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific, 10010023)

- TrypLE™ Select Enzyme (1x), no phenol red (Thermo Fisher Scientific, 12563011)
- Costar® 6-well Clear TC-treated Multiple Well Plates (Corning, 3516)

方法

PBSとTrypLE™ Select Enzymeを用いて剥離したHepG2細胞を、6ウェルプレートの各ウェルに、 0.5×10^6 、 0.75×10^6 、 1.0×10^6 細胞/ウェルの細胞密度で播種しました。培地には、10% FBSを加えたDMEMを使用しました。播種した細胞は、BioStation CTで37°C、5% CO₂ 環境下で培養しました。

播種2時間後から、6時間毎に3日間、10倍の対物レンズで、ウェル中心部の8×8視野(約6.4 mm × 6.4 mm)の位相差画像を撮影しました。撮影は、ウェルごとに一番初めの視野でオートフォーカス調整した後、その設定値を用いて同一ウェル内を撮影しました。

得られた画像データは、ND2 Generator for BS-CTを用いてND2形式の画像ファイルに変換した後、NIS-ElementsとCell Analysisモジュール「細胞占有面積率」を用いて解析し「Confluency (%)」(視野全体に占める細胞存在領域の面積比)を自動計測しました。操作画面上で細胞が存在している領域のマスク表示と計測数値を確認しました。csv形式で出力された数値をグラフ化し、細胞占有面積率が約30、50、70%となった時期を確認しました。

結果

1.0×10⁶細胞/ウェルの密度で播種し2時間後から6時間毎に観察した条件において、細胞占有面積率が30、50、70%となったのは、それぞれ約14、32、50時間後でした(図1)。

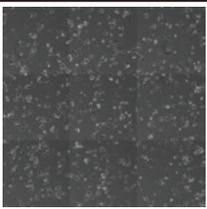
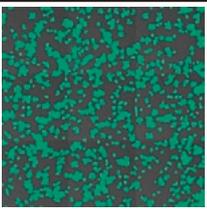
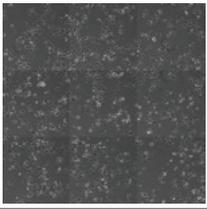
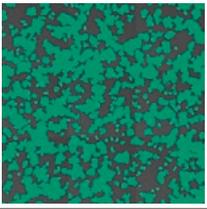
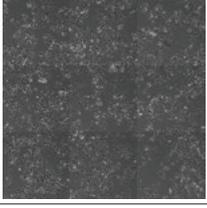
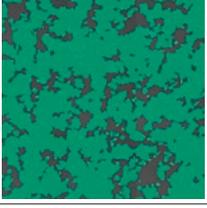
| 培養時間 (時間) | 細胞占有 面積率(%) | 位相差画像 | マスク画像 |
|--------------|----------------|--|--|
| 14 | 31.1 |  |  |
| 32 | 48.5 |  |  |
| 50 | 71.1 |  |  |

図1. 位相差画像と細胞存在領域を緑色で表示したマスク画像

HepG2細胞を1.0×10⁶細胞/ウェルの密度で播種し培養した細胞のうち、3×3視野の細胞画像とマスク画像を示しました。得られた細胞占有面積率の数値を百分率(%)に換算して表示しました。

次に、異なる細胞数で播種されたウェルにおける培養期間全体の細胞占有面積率の経時的変化をグラフ化しました(図2)。細胞播種密度ごとに、所定の細胞占有面積率に達するまでに要する時間が異なることを確認できます。

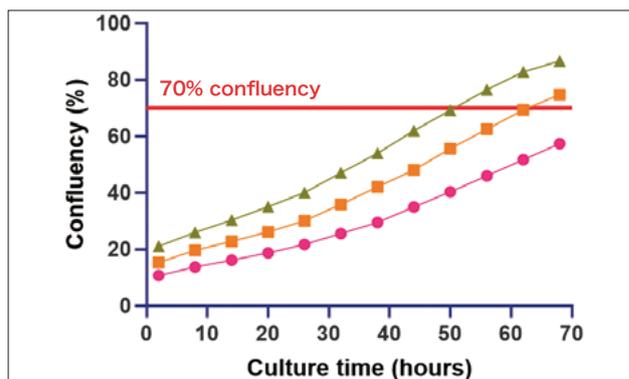


図2. 播種密度の違いによる細胞占有面積率の変化

0.5×10⁶(マゼンタ)、0.75×10⁶(橙)、1.0×10⁶(緑)細胞/ウェルでHepG2細胞を播種した各ウェルの細胞占有面積率の経時変化を示します。70%の位置に70% confluencyの基準線を示しました。

まとめ

- NIS-ElementsとCell Analysisモジュール「細胞占有面積率」を組み合わせることで、HepG2細胞の培養工程中の位相差画像から自動的に細胞占有面積率を計測することが可能になります。
- NIS-Elementsの操作画面上のマスク画像を参照することで、細胞の占有領域が適切に認識されているかどうかを簡単に確認することができます。
- 培養工程中の細胞の状態をモニターし、細胞占有面積率の情報を得ることは、アッセイや継代のタイミングの決定に役立ちます。
- 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。

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や、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、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