



Cell Analysisモジュール

「hPSCコロニー面積パッケージ」を用いた iPS細胞の個別コロニー占有面積等の計測

< BioStation CT 使用例 >

はじめに

- Cell Analysisモジュール「hPSCコロニー面積パッケージ」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、iPS細胞コロニーの一つ一つを個別に認識し、コロニーの数、個別面積、平均面積、総面積、コロニー占有面積率を同時に計測することができます。
- iPS細胞を安定的に維持培養するためには、継代時に適切な条件で剥離分散されることが重要です。Cell Analysisモジュールを用いて、形成されるコロニーサイズの均一性を確認することにより、剥離分散の条件検討、作業者間の培養手技のばらつきを簡易的に評価することができますようになります。

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

- hPSCコロニー面積パッケージ PC-AR-02 (Nikon, MQS60002)

細胞

- ヒトiPS細胞Tic-FX (JCRB細胞バンク, JCRB1331.01, MRC-5由来, フィーダーフリー培養に適応させたTic細胞 (JCRB1331) の亜株)^(1及び2)

試薬及び材料

- TeSR™-E8™ Kit for hESC/hiPSC Maintenance (STEMCELL Technologies, 05990)
- Fibronectin from bovine plasma (SIGMA-ALDRICH, F1141)
- StemPro™ EZPassage™ Disposable Stem Cell Passaging Tool (Thermo Fisher Scientific, 23181010)
- Cell Scraper S (Sumitomo Bakelite, MS-93100)

- Corning® 25cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap (Corning, 430639)

方法

TeSR™-E8™培地で継代維持し、培養したTic-FX細胞をEZPassage™とCell Scraper Sを用いて剥離分散し、FibronectinでコートしたT-25フラスコにクランプで播種しました。播種した細胞は、BioStation CTで37°C、5% CO₂、加湿環境下で3日間培養しました。

播種後3日目から12時間毎に4倍の対物レンズで、フラスコ中心部の8×8視野 (約16.0 mm × 16.0 mm) を撮影しました。撮影は、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「hPSCコロニー面積パッケージ」を用いて解析しました。自動解析により、コロニー数「Number of Colonies」、コロニー占有面積率「Confluency (%)」、各コロニーの面積「Colony area (cm²)」、コロニーの平均面積「Mean of Colony area (cm²)」及び全コロニーの面積の総和「Total of Colony area (cm²)」の計測値を得ました。操作画面上でiPS細胞の一つ一つのコロニーのマスク表示と計測数値を確認しました。得られた計測数値をcsv形式で出力し、コロニーの大きさの分布をグラフ化しました。

結果

iPS細胞の各コロニーを個別に認識していることを、マスク表示から確認しました(図1)。

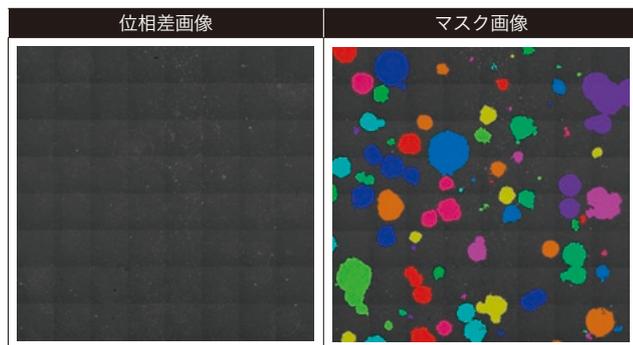


図1. iPS細胞の位相差画像(左)と各コロニー領域マスク画像(右)

位相差画像のコロニー領域をマスクし、ランダムカラーで表示しました。

また、自動計測された個別コロニーの面積の分布をヒストグラムで確認しました(図2)。

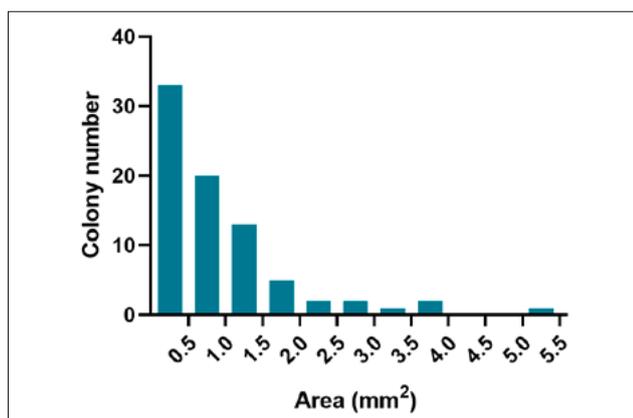


図2. iPS細胞コロニーサイズの分布

得られた計測数値の単位cm²をmm²に換算して表示しました。

まとめ

- NIS-ElementsとCell Analysisモジュール「hPSCコロニー面積パッケージ」を組み合わせることで、iPS細胞コロニーの一つ一つを個別の領域として認識することができます。また、認識された個別コロニーの面積を自動計測し、操作画面上に表示します。
- 得られた計測数値はcsv形式で出力でき、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。
- 培養工程中の細胞の状態をモニターし、細胞の各コロニーの面積、平均面積や総面積の情報を得ることは、アッセイや継代のタイミング決定に役立ちます。

参考文献

1. Shogo Nagata et al., Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells, *Genes Cells*, 14: 1395-1404, 2009.
2. Mika Suga et al., A morphology-based assay platform for neuroepithelial-like cells differentiated from human pluripotent stem cells, *Int. J. Dev. Biol.*, 62(9-10):613-621, 2018.

<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