

表現型スクリーニングにおけるコントロール細胞のバリデーションと細胞形態に応じた解析手法の選択

表現型スクリーニングは、モデル細胞に形態学的な変化を伴う化合物やペプチド、siRNAなどを同定するための、細胞ベースのハイスループットな自動化アッセイです。コントロール細胞や薬剤処理した細胞の顕微鏡画像から、細胞の形状、細胞死、細胞小器官、および蛍光プローブで標識されたタンパク質の変化を定量化することにより、新薬を特定・検証できます。薬剤処理した細胞の形態変化は観察できても、計測結果がコントロール細胞と類似し、薬効による表現型の違いを数値化できなかった経験はありませんか？細胞形態パラメータや解析手法の選択に悩んだことはありませんか？薬効による表現型の違いを分析するには、コントロール細胞のバラツキと細胞の特徴を考慮する必要があります。本アプリケーションノートでは、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsのオプション画像解析モジュールGeneral Analysis 3を用いて細胞領域を識別し、複数の形態パラメータを使用して、形態の異なる3タイプの細胞を分析した例と、各細胞形態に最適な分析方法の選び方を紹介します。

明視野画像からの細胞マスク作成 (*Homogeneous Area Detection*を使用)



図1. 細胞マスク (ピンク) と核マスク (黄色) を明視野画像に重ね合わせ表示 対物レンズ：20倍、Scale bar: 100 µm

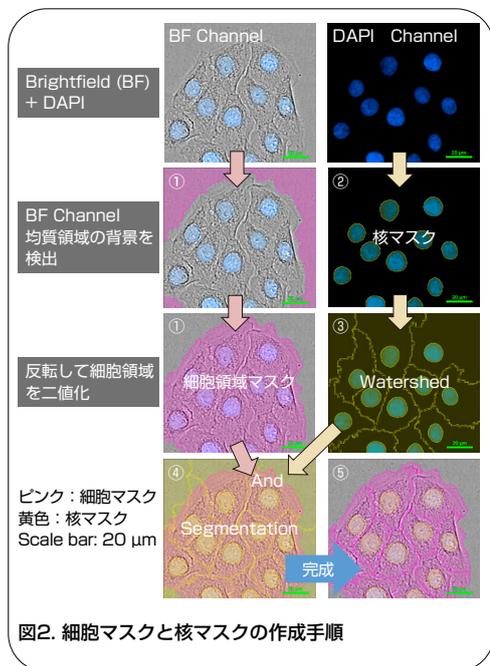


図2. 細胞マスクと核マスクの作成手順

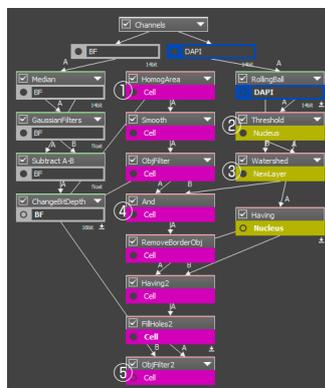


図3. General Analysis 3による解析ブロック

画像解析モジュールGeneral Analysis 3の *Homogeneous Area Detection* は、明視野画像の背景の均質領域を検出する機能です。これを用いて明視野画像の背景領域を二値化し、反転させて細胞領域マスクを作成します①。さらに、蛍光チャンネル画像のDAPI染色された核領域を二値化して核マスクを作成し②、Watershedで分割して③個々の細胞をセグメンテーションすることで④、細胞マスクと核マスクを作成します⑤。細胞領域の識別のためだけに緑色蛍光や赤色蛍光の染色を行う必要はなく、細胞小器官や特定タンパク質の解析のために蛍光波長を効率的に使用できます。

方法

96-wellプレートに播種して培養したHeLa細胞、HepG2細胞、ケラチノサイトを固定し、DAPIで核染色しました。倒立顕微鏡Ti2-E、モノクロカメラ DS-Qi2、蛍光光源D-LEDI、20倍対物レンズを用いて明視野とDAPI画像を撮影し、NIS-ElementsのGeneral Analysis 3で細胞形態解析レシピを作成しました。BatchGA3を用いて画像解析を実施し、Microsoft Excel®でグラフを作成しました。

結果

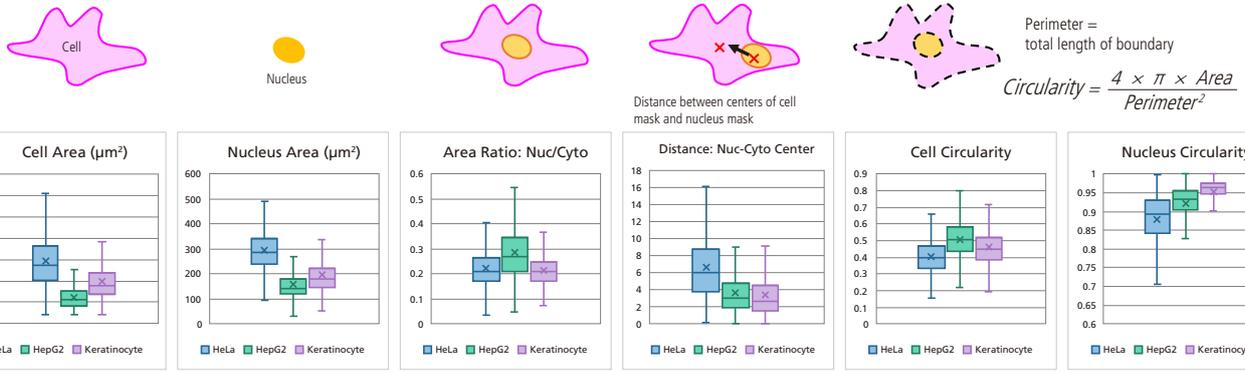
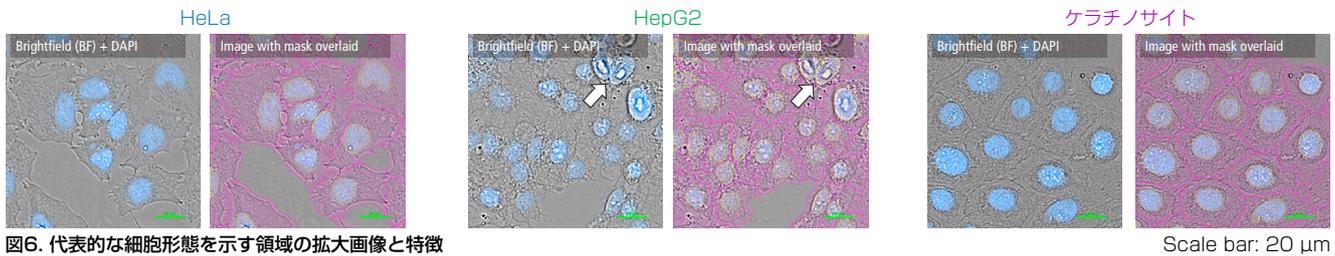
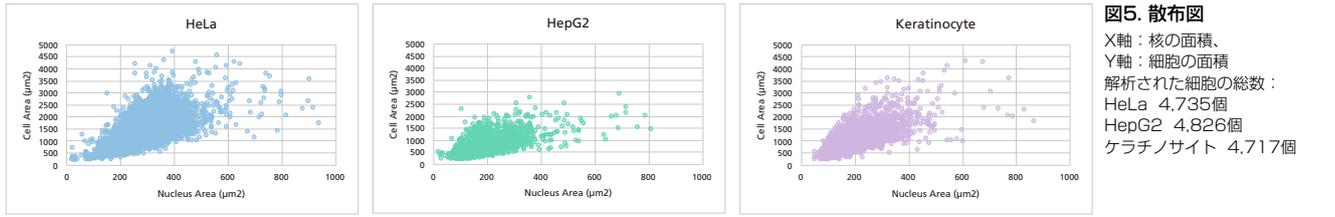


図4. 細胞形態パラメータと解析結果



細胞形態の特徴と画像解析手法の選択

表1. 細胞形態の比較表

	葉状仮足	細胞の境界	細胞質と核のサイズ	核の真円度	核/細胞質 (N/C)の面積比	核の位置	形態
HeLa	大きい	不明瞭	大きい	楕円形	バラツキが少ない	バラツキが大きい	不規則
HepG2	少ない	不明瞭	小さい	丸い	核面積の比率が大きい	核と核の距離が近い	不規則
ケラチノサイト	少ない	明瞭	中くらい	丸い	バラツキが少ない	バラツキが少ない/細胞質の中心	規則的

HeLa細胞は、扁平な葉状仮足を伸展させ、個々の細胞面積のバラツキが大きい(図4、図5)。葉状仮足領域はコントラストが低いため、細胞周辺領域の高精度な検出は困難です。細胞面積は、細胞密度の高い領域では小さく、細胞密度の低い領域では大きい【引用：1】。そのため薬効評価のエンドポイントにおいてコントロール細胞の占有面積率が高い場合、細胞面積をパラメータにしてコントロール細胞と薬剤処理した細胞の表現型の違いを明確にすることは難しい。HeLa細胞の薬効試験のパラメータとして細胞面積を使用する場合は、細胞密度が高くない条件下で評価する必要があります。

HepG2細胞は、Nuc/Cyto面積比が高く(図4)、細胞が凝集しやすい(図6)。核の真円度が高く、細胞間の境界は不明瞭ですが、背景領域と細胞領域のエッジは明瞭で、視野全体における総細胞面積の定量解析は容易です(図6)。

ケラチノサイトは、核の中心と細胞の中心の距離が短く、細胞面積と核面積はやや大きい(図4)。近接した細胞の核と核の距離が長い(図6)ため、核の形態解析は容易です(図6)。

まとめ

表2. 画像解析の容易さ比較

	HeLa	HepG2	ケラチノサイト
細胞カウント・核形態解析	Good	Fair	Excellent
細胞面積・形態解析	Poor	Good	Excellent

- ・ Homogeneous Area Detectionを使用して、明視野画像から細胞マスクを生成し、細胞の形態解析を実施できます。
- ・ コントロール細胞のバラツキを評価することで、最適な解析パラメータを選択できます。

引用

1. アプリケーションノート「ラベルフリーライブセルイメージングを活用した、低光毒性の長期ライブセルアポトーシスアッセイ」SW_app_VC_i_08

製品情報

画像統合ソフトウェアNIS-Elements

オプション画像解析モジュール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。

CFI プランアポクロマート Lambda D 20X

視野数25mmの広い視野の端まで、均一な明るさと高画質を提供します。視野周辺の光量低下が少ないため、蛍光輝度による定量解析の際も、信頼性の高い結果が得られます。

