

APPLICATION NOTE

顕微鏡用AIモジュール*NIS.ai* (Convert.ai/Segment.ai)

機械学習を利用した高精度かつ非侵襲な細胞数計測

細胞数の定量は生物学研究や医学研究にとって重要な手法であるが、蛍光染色した細胞核の計測などには、測定精度や光毒性などについて数々の課題がある。NIS-Elementsソフトウェアに搭載されたNIS.ai機能は、機械学習を利用した細胞計測が可能である。本アプリケーションノートでは、NIS.ai機能を使用することにより、透過位相差画像から高い推論精度で細胞数を計測し、蛍光試薬や励起光照射による影響を回避できることを示した。

非染色細胞の位相差画像から細胞数を正確に定量化

現在、細胞数の計測には血球計や、透過画像内の細胞占有面積率の計測、染色した細胞核の画像処理等が広く用いられる。しかし、これらの手法には、下記のような課題がある。

- ・ 接着細胞を剥離する必要がある。
- ・ 培養中の細胞面積は細胞密度により変化するため、高い精度を得ることが困難である。
- ・ 従来の画像処理では細胞の染色が必要なため、細胞分裂に伴う色素の減色、励起光による褪色や光毒性などがしばしば問題となる。
- ・ 色素染色による細胞への毒性も考慮しなくてはならない。

一方、機械学習を利用したNIS.ai機能による細胞カウントは、上記の課題を解決できるだけでなく、下記の利点がある。

- ・ 少ない教師画像で高い精度の推論が行える。
- ・ NIS-Elementsの既存の画像解析機能と併用することで、より高度な解析が簡便に行える。

そこで、位相差画像を使用して細胞核のデジタルステイン(Convert.ai使用)とセグメンテーション(Segment.ai使用)を行い、その結果に基づく細胞数カウントの精度を、蛍光画像使用時と比較した。

材料と方法

- ・ 細胞：BS-C-1 cells (RFP-laminB1 恒常発現株)、HeLa cells
- ・ 試薬：Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific)、NucSpotLive 488 Nuclear Stain (Biotium Inc.)
- ・ 顕微鏡：倒立顕微鏡Ti-E (Nikon)
- ・ 対物レンズ：CFI S Plan Fluor ELWD ADM 20XC NAO.45 (Nikon)

- ・ 測定条件：上記対物レンズを装着した顕微鏡を用い、ステージトップインキュベータ (Tokai Hit) 内の37℃、5% CO₂の環境下で、2時間ごとにサンプルのタイムラプス画像を取得した。画像取得にはEMCCDカメラ (iXon3, Andor) を用いた。また、固定細胞の撮影も同じ顕微鏡条件で行った。

画像取得後に、NIS.ai機能のConvert.ai または Segment.aiを利用し、細胞核を推定した。その後、NIS-Elementsソフトウェアの核カウント機能を使用して定量化を行った。

学習条件

		Convert.ai		Segment.ai
使用細胞種		BS-C-1 cells	HeLa cells	HeLa cells
学習枚数		70	75	24
教師画像	入力	位相差画像		
	出力	RFP蛍光画像 (laminB1発現)	Hoechst蛍光画像 (核蛍光染色)	目視で作成したセグメントマスク
学習回数 (Iterations)		1000		

結果

位相差画像を使用して細胞核や死細胞の位置・数を推定することが可能なため、蛍光色素の性能や蛍光色素が細胞に与える悪影響について考慮する必要がない。

そのため、繰り返し実施するアッセイや、蛍光色素染色に対してデリケートな細胞の解析に非常に有効である。

また、NIS.ai機能では少ない教師画像で学習・推論が可能である。さらに、既存のNIS-Elementsソフトウェアの機能と併用することで、多様な解析に応用可能である。

1. 細胞核の推定 (Convert.ai を使用)

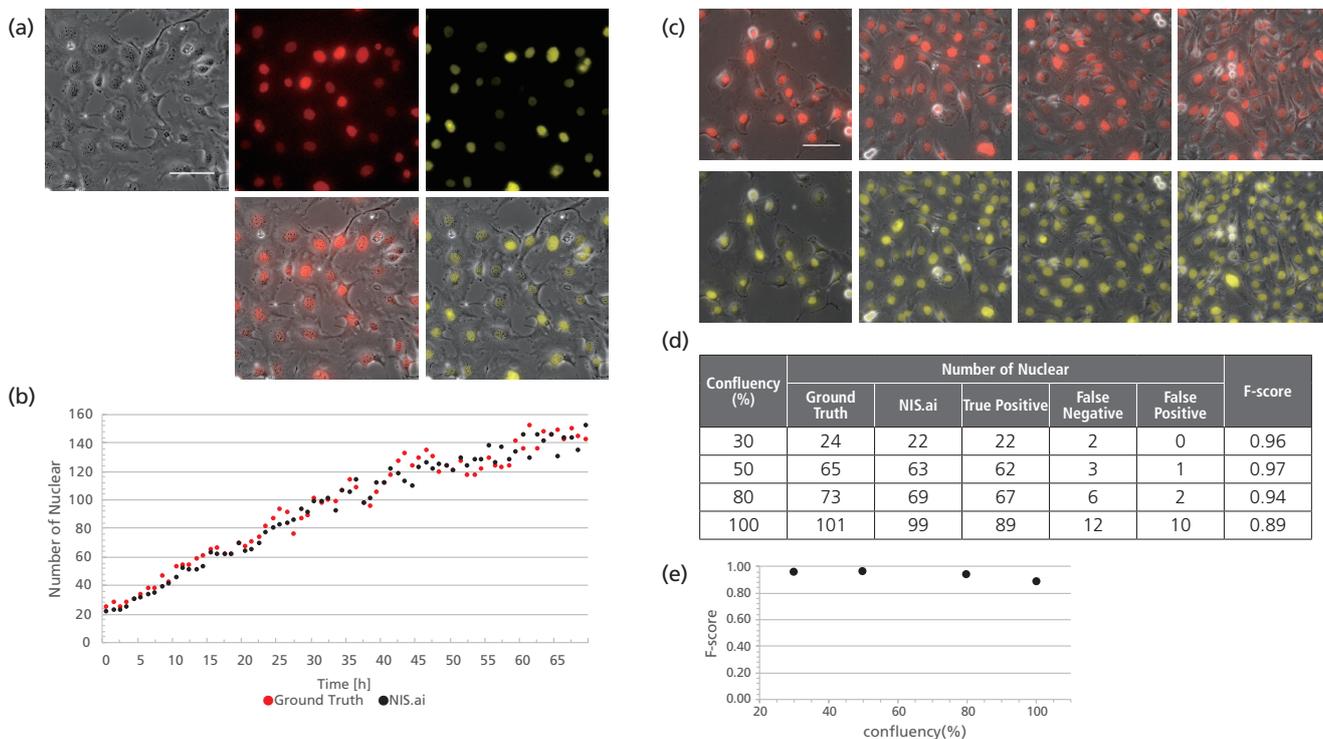


Fig.1 NIS.ai (Convert.ai)を用いた細胞核の推定

(a) 左から、NIS.ai への入力画像 (位相差画像)、ground truthとなるRFP-laminB1蛍光画像、NIS.ai による出力画像。下段は、入力画像とのMerge画像。Scale bar: 100 μ m

(b) 細胞増殖散布図

(c) 異なる密度 (左から30%/50%/80%/100%) の細胞の推論画像。上段は核蛍光のground truth (RFP-laminB1)、下段はNIS.ai (Convert.ai) による出力画像。Scale bar: 100 μ m

(d, e) 精度の定量評価。Ground truthの核とConvert.aiで推定した核のそれぞれの重心座標を用いて、検出(True Positive)、誤検出(False Negative)、過検出(False Positive)を細胞密度毎に判定。F-scoreも算出した。

増殖曲線の作成

顕微鏡画像を使用した細胞増殖性の検証には、蛍光タンパク質発現系細胞や蛍光色素染色などの手法によってカウントした細胞核数や、透過画像視野内における細胞占有面積率が多く用いられる。

しかし、蛍光タンパク質発現系細胞では安定発現株の作製工程が煩雑であり、タンパク質一過性発現細胞では遺伝子導入効率の不安定さや過剰発現による細胞機能への影響の恐れがある。

また、視野内の細胞占有面積率を指標とする場合は、細胞面積が細胞ごとに、またはコンフルエンスによって異なるため、正確な計測が難しい。例えば、コンフルエンスが100%を超えても細胞はしばらく分裂を続けるが、占有率は100%のままである。

そこで、NIS.ai (Convert.ai) を使用して、位相差画像から細胞核の正確な推定が可能か検証した。

方法

- 核膜に局在するRFP-laminB1を恒常的に発現するBS-C-1細胞株を2時間おきに撮影し、検証した (Fig.1 a)。
- あらかじめ、細胞密度 (コンフルエンス20%, 50%, 80%, 100%, 120%) を変えて撮影した教師画像 (位相差画像、RFP-laminB1 蛍光画像) を70枚準備し、学習データセットを作成した。
- 各タイムポイントにおける細胞核数をプロットし、増殖曲線を作成した (Fig.1 b)。

・推定結果の精度を、機械学習における一般的な評価指標であるF-scoreを用いて検証した (Fig.1 d, e)。F-scoreは1に近いほど精度が高いことを示す。

・評価基準は、ground truth画像における核とConvert.aiによる推定核の重心が、10ピクセル以内に存在するか否かでそれぞれの数値を算出した。

結果

- Convert.aiによって推定した、画像内の細胞核局在が、ground truthであるRFP-laminB1の局在とほぼ同一であることが確認された (Fig.1 a)。
- Convert.aiによる推論画像を基に作成した増殖曲線は、蛍光画像によるものと非常に近い曲線を示した (Fig.1 b)。
- 細胞密度が変化しても推定精度は維持されることが示された (Fig.1 c)。
- F-scoreを用いた検証では、いずれの細胞密度においてもConvert.aiは十分な推定精度を維持した。また細胞が増加し細胞同士の距離が接近した状態でも細胞核の推定が可能であった (Fig.1 d, e)。
- 細胞密度が低いほど高い推定精度を示す傾向があった。

まとめ

- NIS.ai (Convert.ai) を使った核のデジタルスタインは、染色を必要とせず高精度の推定が可能である。
- 蛍光励起による光毒性を回避し、染色等の実験コストや作業を削減できるなどのメリットがあるため、NIS.ai (Convert.ai) はユーザーにとって有効なツールである。

2. 生細胞カウント (Convert.aiとSegment.aiを使用)

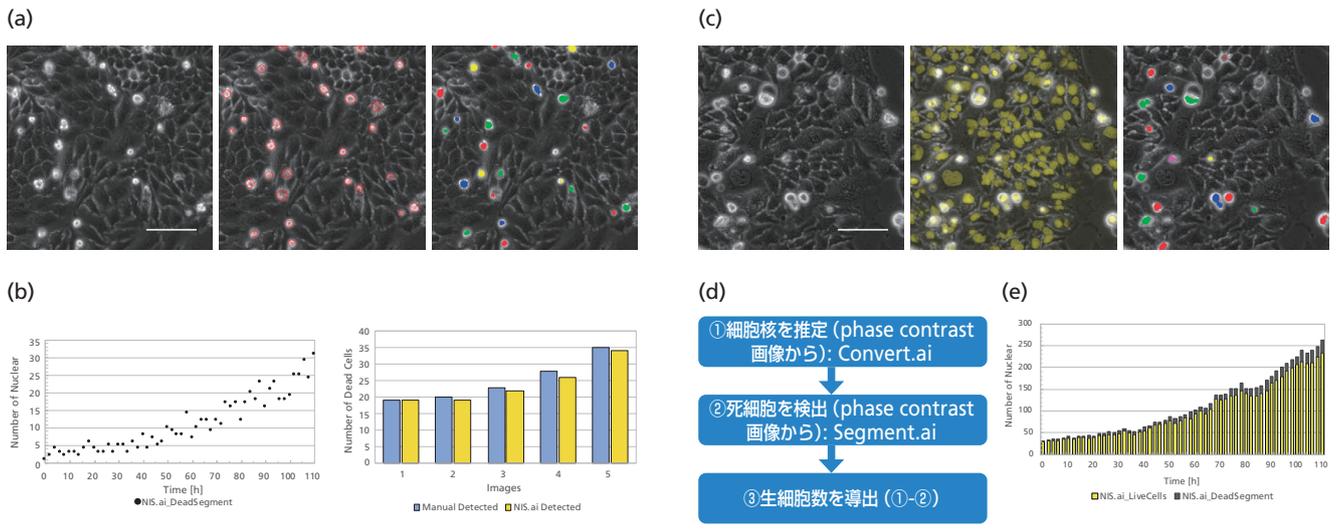


Fig.2 NIS.ai (Segment.ai) を用いた死細胞の検出

- (a) Segment.aiによる出力結果。左：Inputとした位相差画、中央：手動検出による死細胞の位置、右：NIS.ai (Segment.ai)による死細胞の検出。Scale bar: 100 μ m
- (b) 左：Segment.aiによる検出数の経時変化グラフ、右：異なる5視野における、手動検出とSegment.aiで検出した死細胞数の比較。

- (c) 同一視野における推定画像。左：位相差画像、中央：NIS.ai_NuclearStaining: Convert.aiによる出力、右：NIS.ai_DeadSegment: Segment.aiによる検出。Scale bar: 10 μ m
- (d) 生細胞数の導出フロー
- (e) 検出された生細胞数の経時変化グラフ。生細胞数=NIS.ai_LiveCells: Convert.aiによる全細胞の推定数 - NIS.ai_DeadSegment: Segment.aiによる死細胞の推定数。

死細胞の検出

増殖細胞ではコンフルエンスが高まるにしたがって死細胞の数が増えるため、正確な生細胞のカウントに影響がある。一方、簡便に使えるHoechstなどの染色試薬は、死細胞も染色してしまうため、生細胞のみを区別することは難しい。また、washにより死細胞を除去することはできるが、長期間の定点タイムラプス撮影では顕微鏡ステージ上での作業が必要になり煩雑である。

そこで、NIS.ai (Segment.ai) を使用して、効率的な死細胞推定が可能かをHeLa細胞を用いて検証した。

方法

- 教師画像としては、クロマチン凝集の程度、細胞形態、位相差画像のハ口強度を指標に、目視と手動作業にて死細胞マスクの画像を24枚分作成した。
- 全細胞核の推定には予め細胞密度（コンフルエンス 20%, 50%, 80%, 100%, 120%）を変えて撮影した教師画像（位相差画像、Hoechst蛍光染色画像）を75枚準備し、Convert.aiに利用した。

結果

- Segment.aiを利用し、位相差画像から死細胞の領域だけを推定できることが分かった (Fig.2 a)。
- Segment.aiによる死細胞の推論領域は、時間経過と共に増加していく結果が得られた (Fig.2 b)。
- この結果は、培養期間が長くなりコンフルエンスが上昇すると共に細胞死が発生・増加するこれまでの知見と一致する。

- 精度検証のため、目視による検出とSegment.aiによる出力を比較したところ、5つの異なる視野のそれぞれにおいて近似した値が得られた (Fig.2 b)。

次に生細胞数のみのカウントが可能かを検討した。

- Convert.aiで推定した全細胞数から、Segment.aiで推定した死細胞数を引くことで生細胞数が得られる (Fig.2 c, d)。
- 死細胞割合は培養時間の経過と共に増加し、オーバーコンフルエント状態では約20%の死細胞が混在していた (Fig.2 e)。

まとめ

- 従来は、全細胞数や死細胞数のカウントには複数の染色を行う必要があったが、NIS.aiでは透過（位相差）画像のみを使用してこれらの数値を知ることができる。
- 透過画像からのカウントは蛍光染色を必要としないため、検出したい他の目的のために蛍光染色を利用できる。
- 今回の検証では細胞形態を教師モデルの指標にしているため、死細胞に限らず細胞集団の中で特異な形態を示す細胞の検出に利用できることが示唆される。
- NIS.aiの機能は、大量の画像処理を必要とするスクリーニングアッセイや、同時に複数の染色を必要とするアッセイにおいて有効なツールとなり得る。

3. 蛍光色素退色の影響を回避 (Convert.ai を使用)

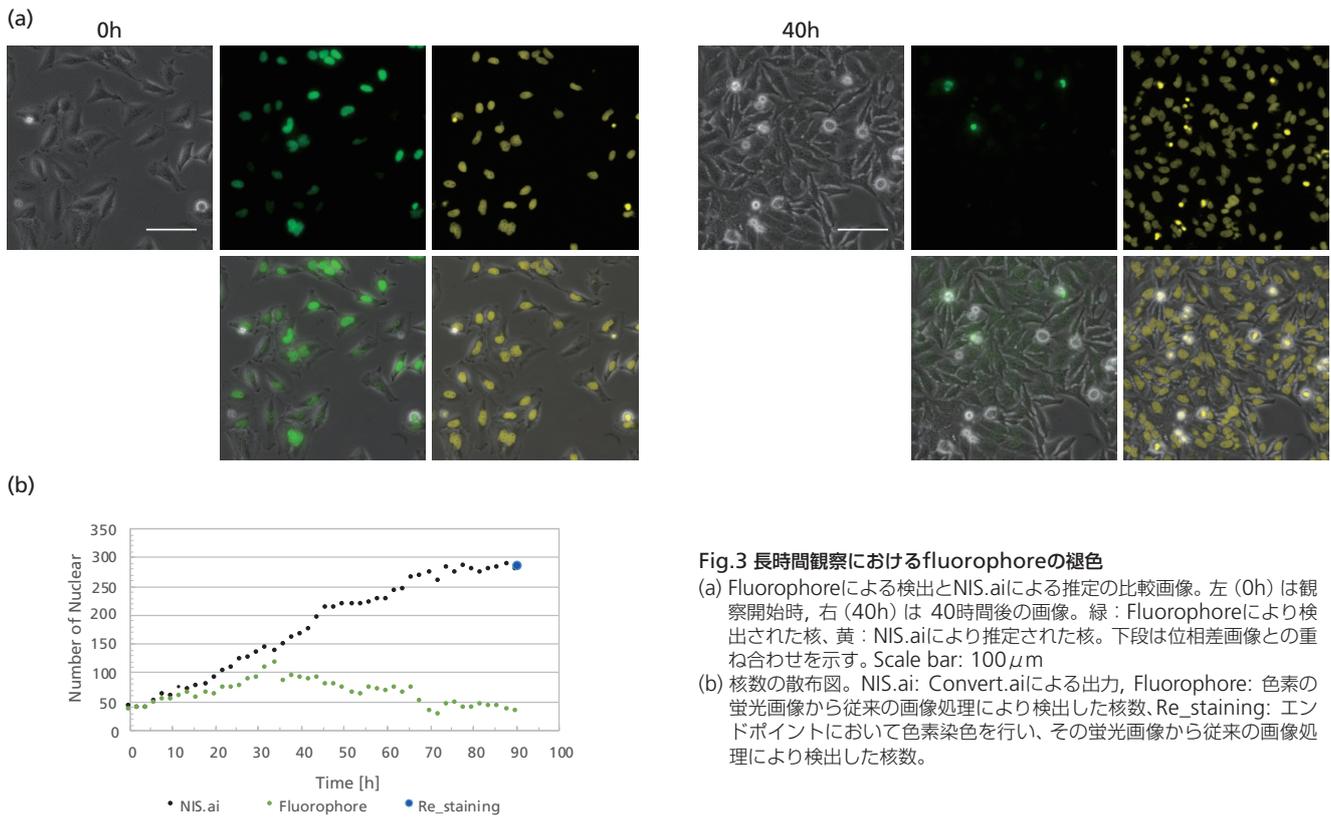


Fig.3 長時間観察におけるfluorophoreの褪色

(a) Fluorophoreによる検出とNIS.aiによる推定の比較画像。左 (0h) は観察開始時、右 (40h) は 40時間後の画像。緑：Fluorophoreにより検出された核、黄：NIS.aiにより推定された核。下段は位相差画像との重ね合わせを示す。Scale bar: 100 μm
(b) 核数の散布図。NIS.ai: Convert.aiによる出力、Fluorophore: 色素の蛍光画像から従来の画像処理により検出した核数、Re_staining: エンドポイントにおいて色素染色を行い、その蛍光画像から従来の画像処理により検出した核数。

増殖曲線の作成

顕微鏡画像を利用した核カウントでは、一般的に蛍光色素を用いて細胞核を染色する。しかし蛍光色素は細胞内で合成されることはないため、分裂に伴って細胞当たりの色素量は減少し、減色してしまう。また、励起光の繰り返しの照射によってもたらされる蛍光の褪色や光毒性のほか、蛍光色素の毒性による細胞動態への影響の可能性も無視できない。さらに、細胞種によっては、蛍光色素が適用できないものや染まりムラが発生するものがある。

そこで、NIS.ai (Convert.ai) を利用して、上記の問題点を解決することが可能か検証した。

方法

- ・ 蛍光色素で染色したHeLa細胞の核を、従来の画像処理を用いてカウントした。
- ・ その細胞数を、Convert.aiによって位相差画像から推定された細胞核数と比較した。
- ・ 細胞核の推定には「2.生細胞カウント」で作成した学習モデルを使用した。

結果

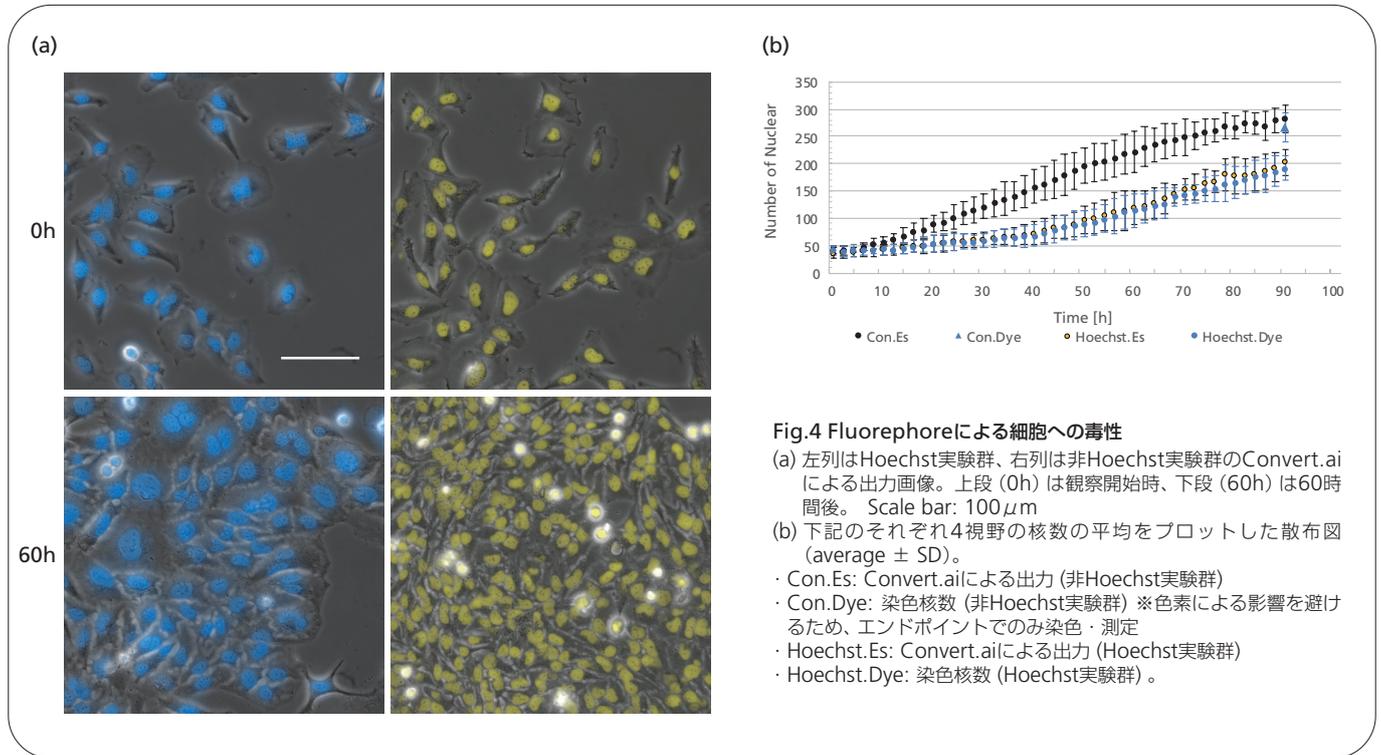
- ・ 蛍光色素を使用して核検出を行う従来の画像処理では、色素の減衰にともなって早い段階から検出が困難になり、時間とともにConvert.aiによる推定結果との乖離が大きくなった (Fig.3 a, b)。
- ・ 精度の確認のためエンドポイントにおいて細胞核を染色し、Convert.aiによる推定と比較した結果、Convert.aiによる推定は細胞数を正確に捉えていることが確認された。

まとめ

NIS.ai (Convert.ai) の下記の利点が認められた。

- ・ 安定した細胞数の推定が可能。
- ・ 核カウントの高い精度を保ちつつ、染色によるコストや作業量の削減、励起光による光毒性の影響を軽減できる。
- ・ 最適な染色条件を検討する必要がなくなる。
- ・ 光毒性が最小限にできるため、長期間観察を必要とするアッセイや、撮影間隔の短いアッセイに非常に有効である。

4. 蛍光色素染色による細胞への影響を回避 (Convert.ai を使用)



色素による影響を検出

広く使用されているHoechst等の細胞核の染色色素は、条件によっては細胞に影響を及ぼすため、注意が必要である。そこで、NIS.ai (Convert.ai) を利用して、Hoechst色素が細胞挙動に与える影響を評価した。

方法

- ・ HeLa細胞の核をHoechstで染色し、従来の画像処理によりカウントした (Hoechst実験群)。
- ・ Hoechst実験群の画像に対しNIS.ai. (Convert.ai) による推定も実施した。
- ・ 対照実験として、別のwellに同数のHeLa細胞を播種し、Convert.aiによって細胞核を推定した (非Hoechst実験群)。
- ・ 非Hoechst実験群の推定精度の確認には、エンドポイントで蛍光色素による染色を行い、従来の画像処理で細胞数をカウントした。
- ・ それぞれの条件において増殖曲線を作成し、それにより染色色素が細胞の増殖に与える影響を評価した。
- ・ 細胞核の推定には「2.生細胞カウント」で作成した学習モデルを使用した。

結果

- ・ Hoechst実験群の細胞核数は、従来の画像処理による細胞核カウントとConvert.aiによる細胞核カウントの結果が一致していた (Fig.4 b)。
- ・ 増殖曲線 (Fig.4 b) により、Hoechst実験群では非Hoechst実験群と比較して増殖が抑制される傾向が確認された (細胞死が増えるためではなく、増殖が抑制されていた)。それは画像 (Fig.4 a) から明らかであった。この現象は、細胞の挙動を正確に把握するための障害となり得る。

まとめ

NIS.ai (Convert.aiやSegment.ai) を使用することで、上記の心配をすることなく、細胞の正しい挙動を把握できる。色素を用いない細胞核検出はユーザにとって有益である。

製品情報

顕微鏡AIモジュール Convert.ai

位相差や微分干渉などの非染色の細胞画像から、蛍光画像を生成するよう学習できます。細胞に蛍光染色を行うことなく長時間タイムラプスが行えるため、励起光によるダメージのない非侵襲な解析を実現します。

顕微鏡AIモジュール Segment.ai

多様な細胞が混在した画像から、目的の細胞だけを識別した画像を生成するよう学習できます。特定の形状や大きさの細胞は、従来の二値化では分類が不可能なため手動による分類を必要としましたが、Segment.aiは学習に基づいて自動的に分類できます。