

# AI使用の高S/N化技術Enhance.aiによる 光毒性低減と蛍光顕微鏡画像の明瞭化

細胞内現象の詳細な解明において、蛍光顕微鏡によるタイムラプス撮影は不可欠な技術であるが、蛍光観察では励起光の光毒性による影響が懸念される。このため、可能な限り低い励起光強度や短時間露光を用いて、色素の褪色や細胞ダメージを防ぎながら、正確な定量解析を可能とする技術が求められている。

北海道大学電子科学研究所の小林健太郎氏は、画像統合ソフトウェアNIS-Elementsの顕微鏡AIモジュールNIS.aiの一つであるEnhance.aiを用い、細胞内のミトコンドリアの長さの定量化から、励起光の光毒性の低減とその評価を行った。本アプリケーションノートでは、その実験例を紹介する。

## 従来の蛍光タイムラプス観察の課題

蛍光顕微鏡観察、特にタイムラプス観察は、刻々と変化する細胞内の詳細をリアルタイムに可視化できるため、現在では細胞内現象の解明に不可欠の技術である。また、顕微鏡技術の発展により、簡単にタイムラプス観察が行えるようになった。優れた蛍光タイムラプス画像のムービーは視覚的にも大きなインパクトがあり、生物学に詳しくない人でも思わず魅入ってしまうほどである。

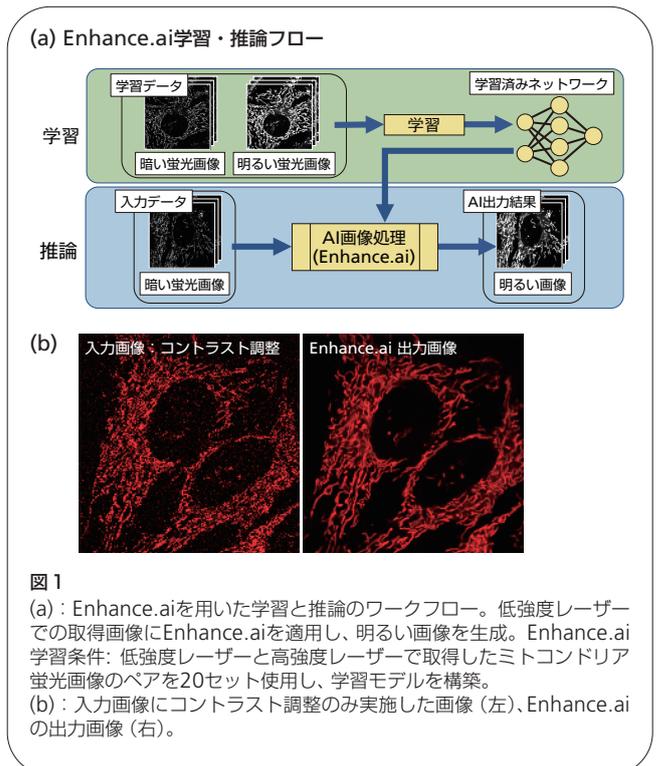
しかし明瞭な蛍光画像の撮影には十分な蛍光シグナルの取得が必要であり、そのためには強い励起光の照射や長い露光時間が必要となる。度重なる励起光照射により、蛍光色素の褪色や活性酸素種の産生による光毒性の影響は不可避である。結果として、蛍光輝度の低下によって定量評価の信頼性が大幅に低下する、あるいは細胞にダメージが生じて観察目的とする生物現象にも影響を与えてしまう懸念が大きい<sup>1,2</sup>。また、長時間露光ではターゲットが動いてしまうことにより、明瞭な画像が得られないという懸念も生じる。

これらの理由により、タイムラプス観察では、データが褪色により徐々に暗くなってしまったり、暗く不明瞭な蛍光画像しか得られないことが多いのが実状であった。

## Enhance.aiは、ノイズを低減しながら明るい画像取得が可能

ニコンが開発したEnhance.aiは、ディープラーニングを用いた新しい画像処理機能である。暗い蛍光画像と明るい蛍光画像のペアをあらかじめネットワークに学習させることにより、暗い蛍光画像から明るい蛍光画像を構築することができる(図1. (a))。

一般的に、暗い蛍光画像をコントラスト調整で強調すると、蛍光シグナルとノイズの差が小さいため、ノイズも増強されて不鮮明な画像になるが、Enhance.aiを用いた場合はS/N比の高い画像を得ることができる。オリジナルの暗い蛍光画像にコントラスト強調を行った画像では、ノイズも強調されてしまい、良好な観察ができているとは言いがたい。一方、Enhance.aiによる処理を行った画像では、蛍光シグナルのみが強調され、個々のミトコンドリアが明瞭に観察できていることがわかる。(図1. (b))。



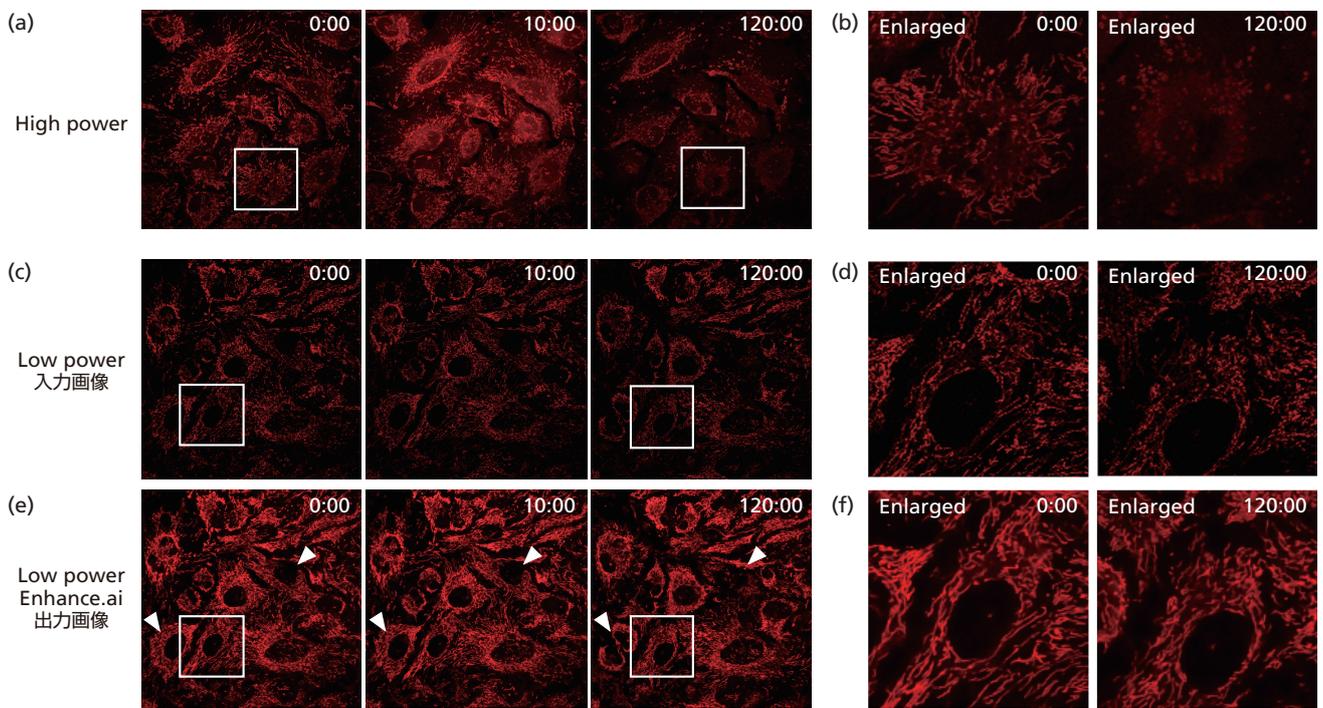


図2

(a)：高強度レーザーによるタイムラプス撮影の0分、10分、120分時点の画像。  
 (c)：低強度レーザーによるタイムラプス撮影の0分、10分、120分時点の画像。  
 (e)：画像(c)を入力画像としてEnhance.aiを適用した出力画像。Δは分裂中の細胞。

(b)(d)(f)：画像(a)(c)(e)内のROIの拡大画像

サンプル：MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, M7512) で標識したHeLa細胞

取得デバイス：Ti-E倒立顕微鏡+A1Rsi共焦点顕微鏡システム、対物レンズ：CFI アポクロマート Lambda S 60X Oil、ステージインキュベーター：STXG-WSKMX (東海ヒット製)

測定条件：レーザー強度：High 1.4%、Low 0.1%、撮影時間：10秒間隔で120分間

画像ご提供：北海道大学電子科学研究所 小林健太郎氏 (北海道大学二コニイメージングセンターにて画像取得)

## Enhance.aiはタイムラプス観察において細胞ダメージを低減

ミトコンドリアはATP産生のものであり、細胞内のエネルギー供給に大きく関わっている。このため細胞内ミトコンドリアの形態や挙動の経時変化は、細胞の状態をうかがうバロメーターとなる。タイムラプス観察は、これらの現象を捕捉するうえで非常に有効な手段である<sup>3</sup>。

その際に重要なことは、励起光による光毒性の影響を可能な限り排除することである。やや強い励起光を照射して観察を行ったところ、ミトコンドリアは観察開始から10分程度で光毒性が顕在化し、120分では断片化が進行し完全に崩壊していることが確認された。これは励起光によるダメージが、ミトコンドリアや細胞本来の機能に大きな影響を及ぼしていると推察される (図2.(a-b))。一方、最低限の励起光での観察では、Enhance.ai処理を実施することで個々のミトコンドリアが非常に明瞭になり、120分後でも断片化や褪色がほとんど生じていなかった (図2.(c-f))。また120分間の観察中には、滞りなく細胞分裂が完了しており、通常と同様の細胞機能が維持されていることを裏付けている (図2.(e)中のΔ)。

これらの結果から、Enhance.aiを用いることによって、タイムラプス観察においても励起光の照射に伴う光毒性や褪色の影響を最小限に抑え、明瞭な画像取得が可能であることが示された。

## 細胞内のミトコンドリアの長さの定量化により、光毒性の影響低減を評価

次に、ミトコンドリアの経時変化を定量的に評価した。NIS-Elementsの定量化機能であるGeneral Analysisを用いてミトコンドリアのセグメントを実施したところ、Enhance.ai処理後の画像においてもミトコンドリアの形態を正確に捉え、計測が可能であった (図3. (a))。

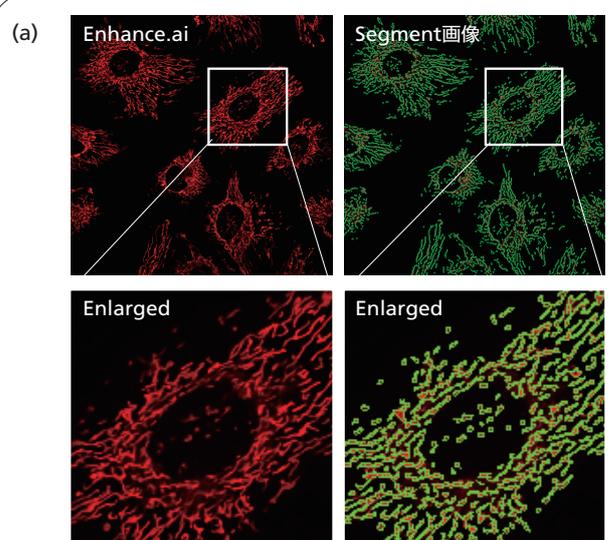
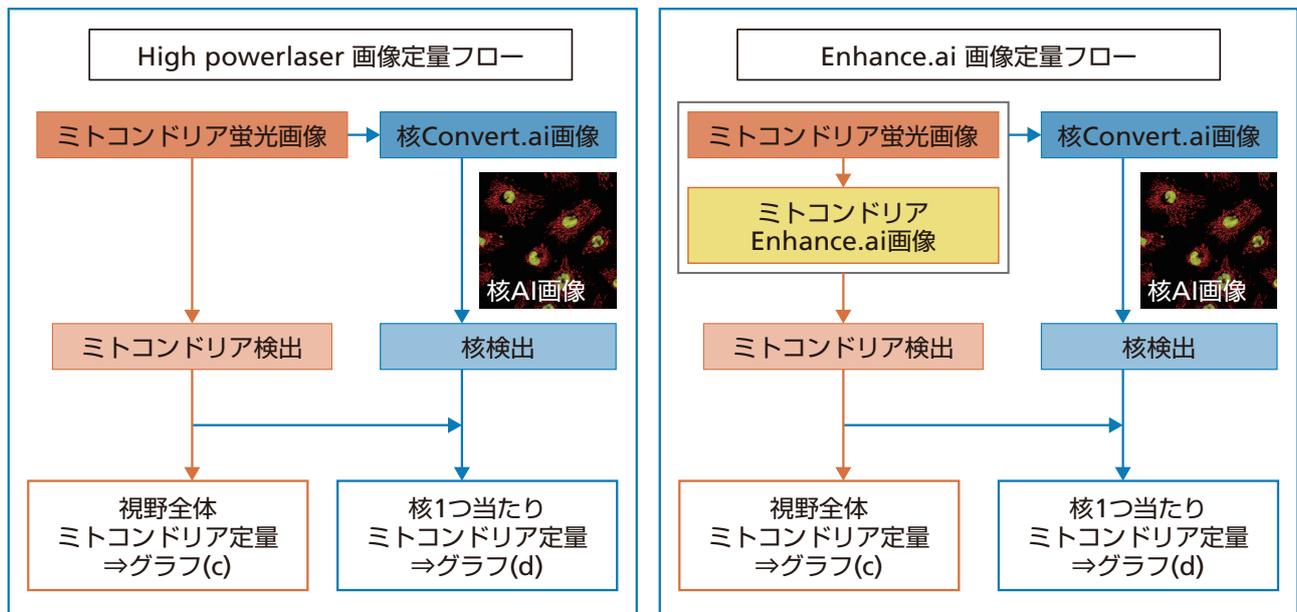


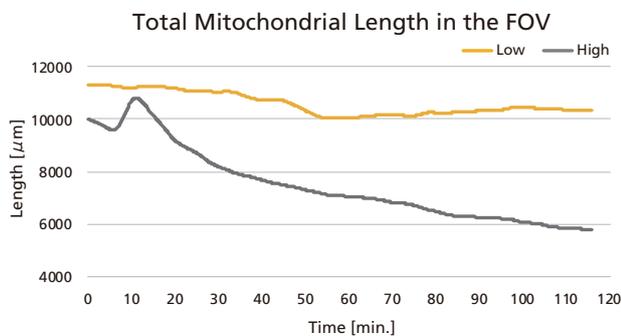
図3

(a)：左列：Enhance.aiの出力結果 (上段) と拡大画像 (下段)。右列：左列画像からミトコンドリアを検出したバイナリマスク (緑)。

(b)



(c)



(d)

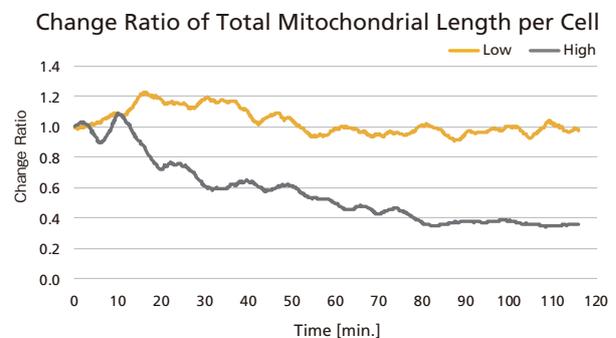


図3

(b) : ミトコンドリアの定量化ワークフロー。Convert.ai学習条件: ミトコンドリアと核 (Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, H3570) で標識) の蛍光画像のペアを20セット使用し、学習モデルを構築。

(c) : 視野内のミトコンドリア長さの総和 [ $\mu\text{m}$ ] の経時変化 [min.]。各時点の値は移動平均 (n=25) を求めた。

(d) : 細胞一つ当たりのミトコンドリア長さの総和から算出した変化率の経時変化 [min.]。各時点の値は移動平均 (n=25) を求めた。

今回は視野内のミトコンドリア長さの総和と、細胞1個当たりのミトコンドリア長さの総和を算出し、それぞれの経時変化を計測した。視野内の細胞数は、NIS.aiの一つであるConvert.aiを用い、ミトコンドリア蛍光画像から核領域を推定することにより算出した(図3. (b))。

強い励起光での観察では、観察開始直後からミトコンドリアの断片化と崩壊が進行し、光毒性の影響が強く現れていた。このような条件下では細胞の挙動を正しく計測できているとは言いがたい。一方、弱い励起光の場合は、120分間の観察を通して値がほぼ一定であり、励起光を最小限に抑えた条件下でも正確な計測が可能であることが示された(図3. (c-d))。

## まとめ

以上のように、Enhance.aiを用いることで、従来は励起光による影響の懸念があるため躊躇されていた、短いインターバルでの観察や極めて長時間のタイムラプス観察も可能となる。具体例を挙げると、細胞内での小胞輸送は極めて高速の現象である上、分子レベルの観察では蛍光シグナルが弱い場合観察が非常に困難であるが、今後はこうした研究にEnhance.aiが応用できると思われる<sup>4,5</sup>。

さらにNIS-Elementsを活用することで簡便に正確な定量評価が可能であることから、蛍光顕微鏡では評価が困難であった生命現象の可視化が、Enhance.aiを有効に用いることで達成できるものと期待される。

## 参考文献

- 1) Laissue et al. Nature Methods. 2017; 14(7): 657-661.
- 2) Knight et al. Am J. Physiol. Cell Physiol. 2003; 284: 1083-1089
- 3) Mehta et al. J. Biol. Chem. 2019; 294(10): 3385-3396
- 4) Tojima et al. J. Cell Science. 2019; 132: jcs231159
- 5) Rosendale and Perrais. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2017; 93: 41-45

## 門井 宏平、武居 俊輔

株式会社ニコン ヘルスケア事業部 システム開発部第一開発課

## 畑口 剛之

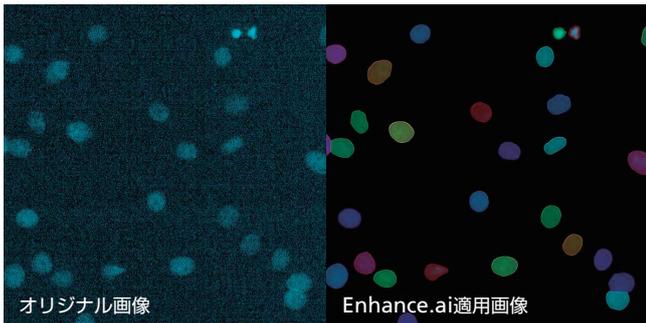
株式会社ニコン ヘルスケア事業部 設計部第四設計課

## 製品情報

信頼性の高い測定・解析結果を得るためには、関心領域のみを高精度に抽出することが不可欠です。ニコンの画像統合ソフトウェアNIS-Elements専用の顕微鏡AIモジュールNIS.aiは、ディープラーニングを利用して画像処理を自動化。画像の取得中または取得後にNIS.aiを適用することにより、光毒性を抑え、関心領域のみを高精度に検出可能な画像に変換します。「Enhance.ai」「Convert.ai」「Segment.ai」は、ユーザー独自の教師画像を用いてネットワークに学習させることができるため、アプリケーションごとに最適な結果が得られます。

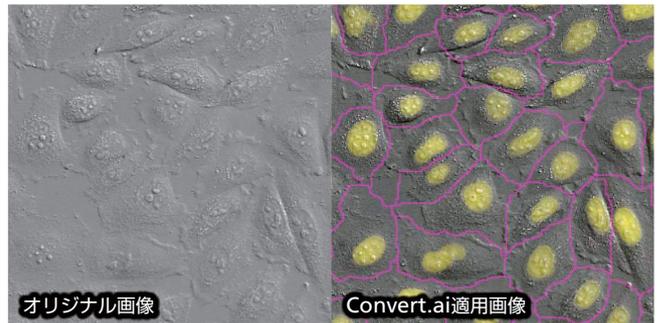
### Enhance.ai

蛍光シグナルの弱い画像から、S/N比に優れた高コントラスト画像を生成するよう学習できます。短時間露光や微弱励起光により取得した蛍光画像を用いて、正確なセグメントが行えるため、光毒性を抑えた解析を実現します。



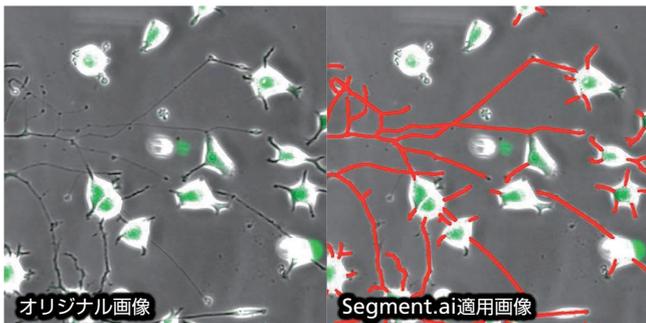
### Convert.ai

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。



### 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。



その他詳細、作例、動画、製品情報など: [https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja\\_JP/](https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/)



お問い合わせ

株式会社 **ニコン ソリューションズ**

バイオサイエンス営業本部  
140-0015 東京都品川区西大井 1-6-3 (株式会社ニコン 大井ウエストビル 3F)  
電話 (フリーダイヤル) 0120-586-617  
<https://www.nsl.nikon.com>

