

深層学習技術を用いた、ニューロン領域およびアストロサイト領域のラベルフリー検出

複数種の細胞を共培養する場合、細胞種を特定するためには、一般にマーカー分子を用いた細胞標識を行う必要がある（参考文献1）。しかし、免疫染色による標識は細胞を固定する必要があるため、生細胞観察には適さない。また、蛍光タンパク質などで生細胞を可視化する場合、遺伝子導入時や蛍光観察時の細胞への毒性が課題となる場合がある。

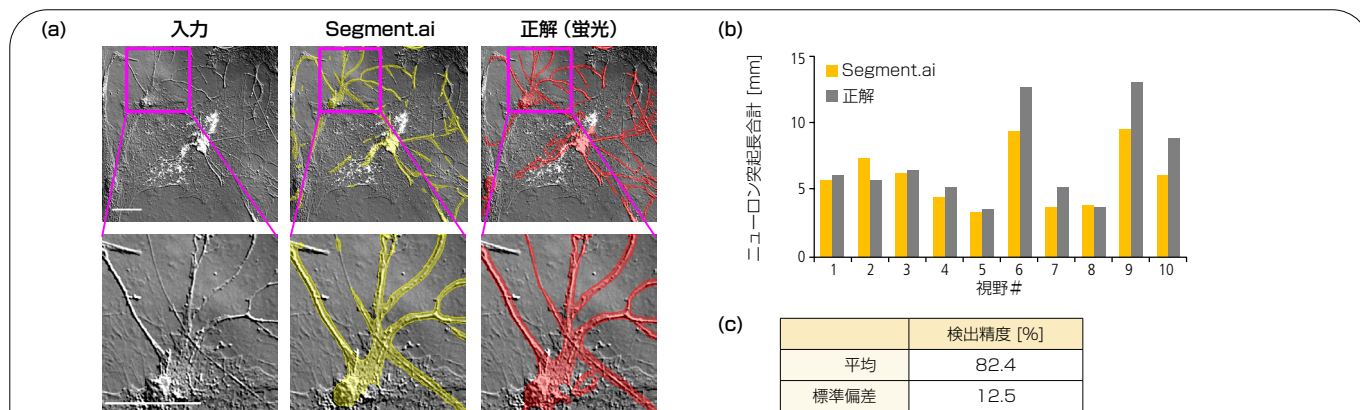
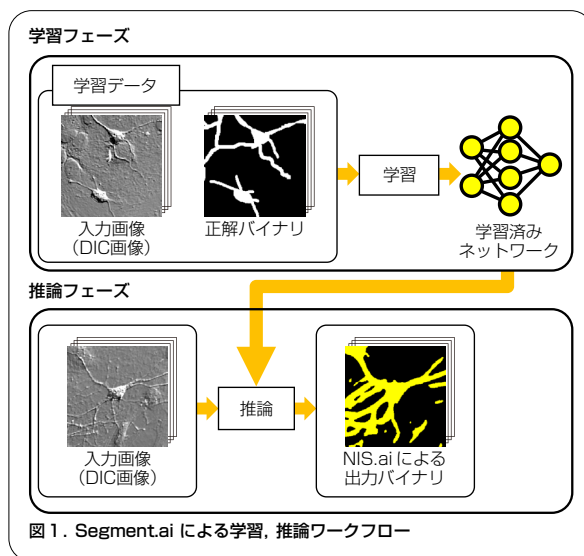
画像統合ソフトウェアNIS-Elementsの深層学習モジュールであるNIS.ai (Segment.ai) は、従来の二値化や画像処理では抽出が困難であった特定の細胞領域を、学習により検出可能とする技術である。本法を用いることで、複数の細胞種からなる非標識画像から各細胞種を検出することが可能となる。

本アプリケーションノートでは、自然科学研究機構 生命創成探究センター長である根本知己先生、同センター バイオフォトリクス研究グループの石井宏和先生、堤元佐先生にご協力いただき、ニューロンとアストロサイトの細胞共培養サンプルの透過（DIC）観察像からSegment.aiを用いてそれぞれの細胞領域を検出して定量解析した事例を紹介する。

キーワード：NIS.ai, Segment.ai, ラベルフリー解析、神経系細胞

方法

ニューロンとアストロサイトの共培養サンプルを培養10日後に4% paraformaldehydeで固定し、ニューロンマーカーであるsynaptophysinに対する抗体を用いて免疫染色で標識した。そのサンプルのDIC画像を取得し、学習用・推論用画像として用いた。取得したDIC画像から全細胞領域の正解バイナリの作成（アノテーション）、さらにニューロン領域についてsynaptophysin蛍光標識画像を参照してアノテーションを行い、学習データ（40セット）を用意した。これらのデータを用いてSegment.aiで1000回の学習を行い、学習済みSegment.aiモデルを作成した。このモデルをDIC画像からのニューロン領域およびアストロサイト領域の推論に適用した（図1）。



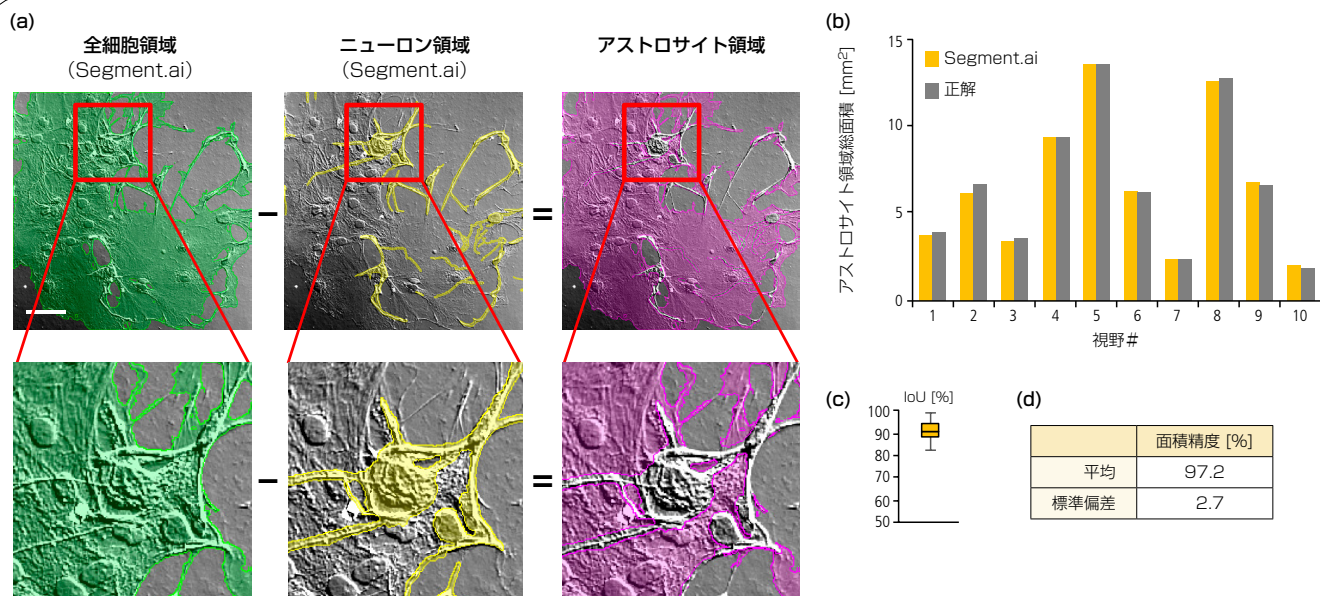


図3. DIC画像を用いたアストロサイト領域の検出

- (a) アストロサイト領域の検出方法。Segment.aiを用いて全細胞領域(左)、ニューロン領域(中)を検出し、差し引くことによりアストロサイト領域(右)を特定した。下段は上段画像の拡大画像。Scale Bar: 50 μm
- (b) 推論した10視野それぞれで求めたアストロサイト領域総面積[mm²]。黄: Segment.aiによる出力を用いた定量結果。グレー: 正解バイナリを用いた定量結果。
- (c) 推論した10視野に対するIoU (Intersection over Union) の箱ひげ図。IoUは正解領域と推論領域の重なりを評価する指標であり、下記の式により求めた。精度が良いと100%に近い値となる。

$$IoU[\%] = 100 \times [\text{Segment.ai検出領域と正解領域の積集合面積}] / [\text{Segment.ai検出領域と正解領域の和集合面積}]$$
- (d) 推論した10視野の検出精度[%]。精度は下記の式により求めた。

$$\text{精度}[\%] = 100 - (100 - [\text{Segment.ai定量結果}] \times 100 / [\text{正解定量結果}])$$

結果

前項で作成した学習済みSegment.aiモデルを適用することにより、ニューロン・アストロサイト共培養サンプルのDIC画像のみから各細胞種の領域検出を試した(図2a)。検出されたニューロン領域と正解領域の突起長を比較した結果、82.4%の精度で一致した(図2b, 2c)。さらに、全細胞領域をDIC画像から検出するSegment.aiモデルを併用し、全体からニューロン領域を差し引く方法で、アストロサイト領域の検出も試した(図3a)。その結果、アストロサイト領域についても、正解領域との面積比較において、高精度(97.2%)の定量性が確認できた(図3b, 3c, 3d)。

考察/まとめ

NIS.aiの活用により、透過(DIC)観察画像の入力のみからニューロンとアストロサイトの各領域を特定し、突起長や面積を高精度に定量できた。

神経細胞の研究では10日を超える長期培養を要する場合もある(参考文献2)。本手法ではそのようなサンプルのタイムラプス観察において、ラベルフリーでの解析が可能となることから、標識によって生じる細胞毒性を回避した低侵襲での培養実験への応用などが期待される。

材料

細胞

- マウス由来初代培養ニューロン、アストロサイト(共培養)

抗体

- 抗synaptophysin抗体(ニューロンマーカー)
(ウサギ, GeneTex, #GTX100865, 1:400)
- Alexa Fluor 488標識抗ウサギIgG抗体
(ヤギ, Invitrogen, #A11034, 1:200)

観察・解析環境

- 顕微鏡: Eclipse Ti2-E
- 対物レンズ: CFI Plan Apochromat VC 20X
- 微分干渉装置:
モジュール: LWD DIC N1 Dry TC-C-ML-N1D
スライダー: DIC PF ELWD 20xc T-C
- CMOSカメラ: DS-Qi2
- 撮影・解析ソフトウェア: NIS-Elements AR v5.40.00
- GPU: NVIDIA GeForce RTX 2080 Ti

参考文献

- N. Goshi *et al.*, "A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation". *J. Neuroinflammation*. 17:155. (2020).
- R. T. Roppongi *et al.*, "Low-density primary hippocampal neuron culture". *JoVe*. doi:10.3791/55000. (2017)

製品情報

顕微鏡用AIモジュール NIS.ai

画像統合ソフトウェア「NIS-Elements」を拡張する画像処理・解析モジュールNIS.aiには、Enhance.ai、Convert.ai、Segment.ai、Clarify.aiの4種類のAIモジュールがあります。

本アプリケーションノートで使用したSegment.aiは、解析したい細胞や構造などの領域のみをセグメンテーションするよう学習できます。これにより、従来の二値化ではターゲット抽出が困難だったケースや、手作業による分類が必要だったケースに、新たなソリューションを提供します。