APPLICATION NOTE

倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2-E
顕微鏡AIモジュール *NIS.ai* (Convert.ai)

プライマリー細胞を用いた、ディープラーニングベースのラベルフリー形態解析

従来、*in vitro*の薬効・薬理試験や創薬の安全性試験には、不死化した無限に増殖する株化細胞が使用されてきましたが、株化細胞は正常細胞の遺伝子に変異が蓄積し、もとの組織の性質が失われていることが分かってきました。そのため、もとの組織の性質を反映している正常細胞や患者由来のプライマリー細胞を用いた*in vitro*試験が求められています。しかし正常細胞は、限られた回数しか分裂しないため、セルベースアッセイに用いる十分な細胞数を確保することが困難です。一方で、近年ではディープラーニングを用いた画像処理技術により、ラベルフリーでライブセルの形態を解析できるようになり、少ない細胞数から多くの情報を得ることが可能になりました。本アプリケーションノートでは、NIS.aiのConvert.aiを用いて、ヒト表皮細胞であるケラチノサイトの明視野画像から生成したデジタルステイン画像が、蛍光画像よりも細胞領域の識別に優れており、ラベルフリーで細胞の形態解析が可能なことを検証した例を紹介します。

キーワード：人工知能、ディープラーニング、デジタルステイン、ラベルフリー、画像解析、細胞形態解析、創薬

実験の概要

ケラチノサイトを固定して、核をHoechst33342で蛍光染色し、Tubulinを蛍光抗体染色した。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画像と蛍光画像(核：Ex/Em 385/460, Tubulin : Ex/Em 621/697)を36ポイント取得した。明視野画像を元画像とし、蛍光画像をGround Truth画像として28枚の画像を学習に用いて学習モデルを構築した（図1）。未学習の8枚の画像に学習モデルを適用し、推論（デジタルステイン）画像を生成した（図1）。青色蛍光チャネルのHoechstの輝度値5,000以上を核領域と定義し、赤色蛍光チャネルのTubulinの輝度値2,000以上を細胞領域と定義し、GA3で核と細胞領域を二値化するレシピを作成（図2）。蛍光画像とデジタルステイン画像に同じGA3レシピを適用し、核マスクと細胞マスクを生成。Ground Truthの蛍光画像とAI推論画像の細胞形態解析結果を比較して精度を検証した（図3、図4）。

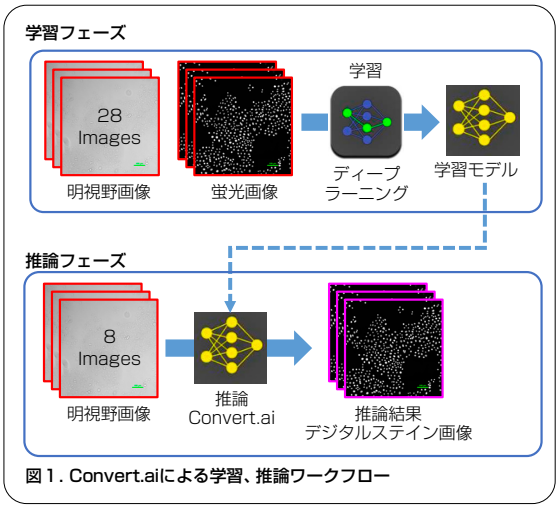


図1. Convert.aiによる学習、推論ワークフロー

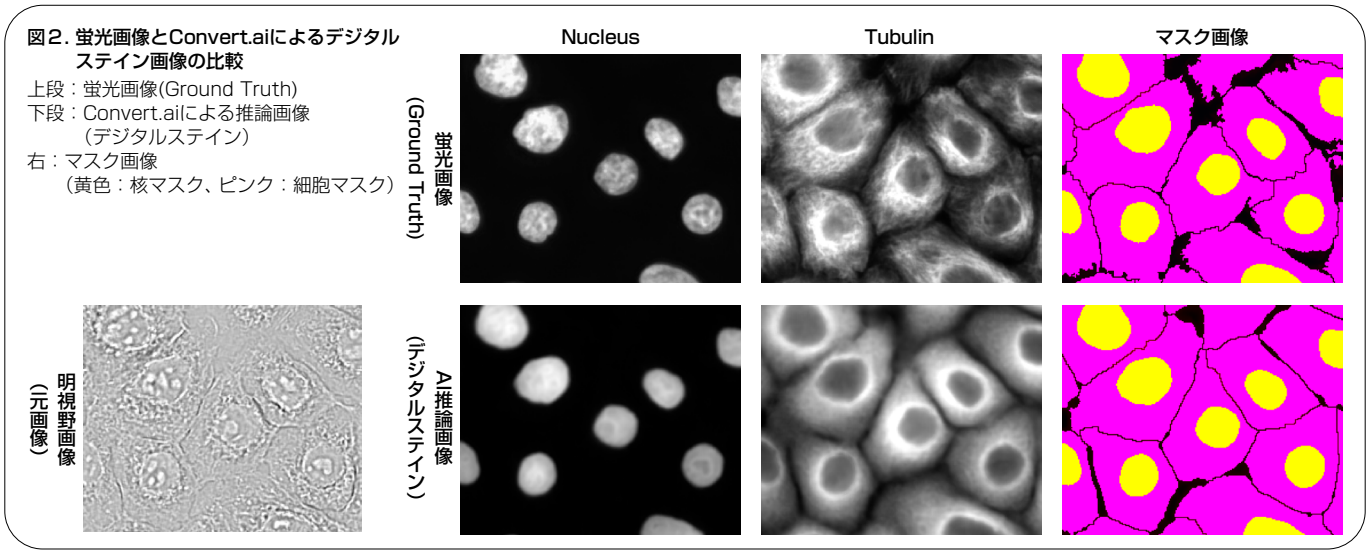


図2. 蛍光画像とConvert.aiによるデジタルステイン画像の比較
上段：蛍光画像(Ground Truth)
下段：Convert.aiによる推論画像
（デジタルステイン）
右：マスク画像
（黄色：核マスク、ピンク：細胞マスク）

結果

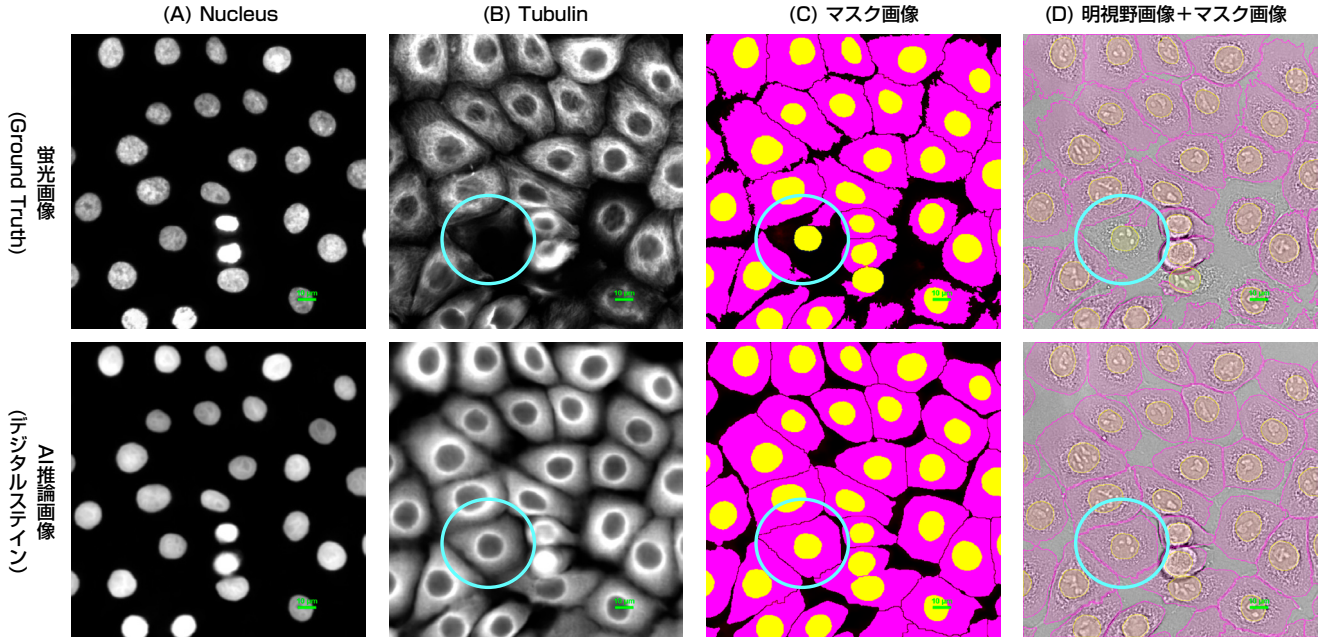


図3. 蛍光画像とConvert.aiによるデジタルステイン画像の比較
左から、(A) 核、(B) Tubulin 、(C) マスク画像（黄色：核マスク、ピンク色：細胞マスク）、(D) 明視野画像にマスク画像をオーバーレイした画像
上段：蛍光画像(Ground Truth)、下段：Convert.aiによる推論画像（デジタルステイン）、Scale bar: 10 µm

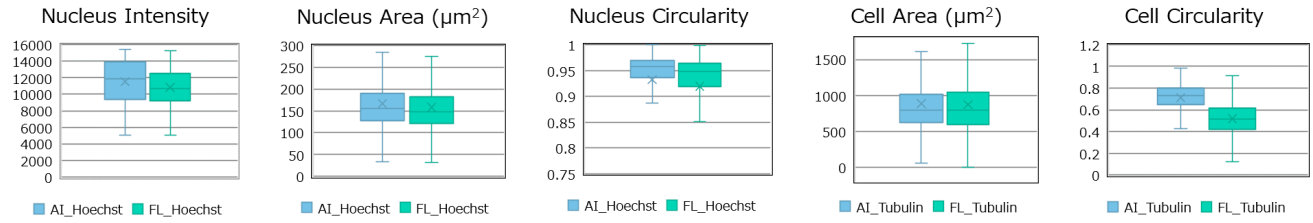


図4. 蛍光画像とConvert.aiのデジタルステイン画像による、細胞形態解析結果の比較
約5,800個の細胞を解析した結果のboxplot。青：Convert.aiによる推論画像の解析結果、緑：蛍光画像の解析結果

約5,800個の細胞を解析した結果、AI推論画像による核の面積と真円率はGround Truthの蛍光画像と類似した結果を示し、デジタルステイン画像から精度の高い核の形態解析が可能であることが分かった（図4）。しかし、核の蛍光強度はConvert.aiによるデジタルステイン画像では正確に可視化できない（図3（A）、図4）。また、繊維状のTubulinは、明視野画像からのConvert.aiによる推論では、微細な繊維構造を可視化できない(図3 (B))。しかし、AI推論画像は蛍光画像よりも細胞領域全体で平滑化された画像が生成されるため、細胞の輪郭に沿ってセグメンテーションが可能であり、細胞の面積と真円率は蛍光画像よりも正確に二値化できていることが分かる(図3 (D)、図4)。Tubulinが発現していない細胞（水色の丸で囲った領域）であっても、明視野画像から細胞領域を推論したデジタルステイン画像では細胞領域を可視化できている（図3(D))。

※アクチンの蛍光抗体染色や低分子化合物のCellMask™ Deep Redも細胞領域の検出やデジタルステインの教師データとして広く利用されています。ご使用の細胞に適した試薬を選択して下さい。

	AI推論画像	蛍光画像
特長	核と細胞領域の識別、細胞形態解析、低光毒性	特定の分子やタンパク質の定量解析、光毒性
核マスク	★★★★	★
細胞マスク	★★★★★	★★★
蛍光強度	N/A	★★★★★
オルガネラ	★	★★★★★

表1. ライブセルイメージングにおける定量解析の適性
核と細胞領域の形態解析は、Convert.aiによる低光毒性のラベルフリー細胞解析が適している。蛍光強度の解析やオルガネラの形態解析は従来の蛍光染色による定量解析が適している。

まとめ

- Convert.aiで生成したデジタルステイン画像から核と細胞の領域を特定し、ラベルフリーで細胞の形態解析が可能です。
- Convert.aiを用いることで、ライブセルによる経時的な変化を記録できるため、少ない細胞数からより多くの情報が得られ、同時にコスト削減も可能となります。
- Convert.aiによる推論画像から核と細胞領域を特定して個々の細胞にセグメンテーションできます。このため、従来法の蛍光染色による蛍光強度やタンパク質の定量解析と併用することで、蛍光励起を最小限に抑えた低光毒性によるライブセルのハイコンテントイメージングが可能になります。
- ライブセルイメージングによるラベルフリー細胞形態解析は、細胞の固定や染色作業が不要なため、業務効率化が可能です。

製品情報

顕微鏡用AIモジュール *NIS.ai*（Convert.ai）

画像統合ソフトウェアNIS-Elements ARのNIS.aiモジュールは、ディープラーニングにより、画像処理や解析のワークフローを改善できます。NIS.aiのConvert.aiは、非染色で核領域を識別することができるため、従来の手法では困難であったライブセルでの定量解析が可能です。