APPLICATION NOTE

顕微鏡モノクロデジタルカメラ Digital Sight 50M

Digital Sight 50Mの高解像性能を活かした低倍対物レンズアプリケーションによる細胞増殖アッセイの高スループット化

96ウェルプレートのようなマルチウェルプレートを用いたスクリーニングアッセイは創薬研究やアカデミアで一般的に行われており、薬剤の候補物質の取得や遺伝子解析に用いられている。近年、スクリーニングは候補化合物を探索・最適化するために必須のものとなっており、アッセイの高速化・品質管理が課題となっている。

本アプリケーションノートでは、高画素数のフルサイズセンサーを搭載したFマウントモノクロカメラであるDigital Sight 50M（DS50M）の特長である高画素数を生かしたアプリケーションとして、ウェル全体像の取得ならびに形態解析による定量評価を行った（Fig.1a）。ウェル全体像をワンショットで取得することにより、(1) 一度の撮像でウェル全体の細胞データを取得できる、(2) ウェル内の細胞の偏りを把握できる、というメリットがある。これらにより、必要十分な定量データの取得とウェル内の状態確認が可能なため、アッセイデータの安定的な取得および効率化に有用である。また、DS50Mの高画素数を生かし、ウェル全体をワンショットで撮像し解析できるため、スループットの大幅な向上が図れる。

本事例では、DS50Mと低倍レンズによる、解析の定量性と撮像スループットにおける有用性を評価するために、比較対象として蛍光観察に広く用いられる高感度カメラを用いて核カウントアッセイを行った。

キーワード: DS50M、スクリーニングアッセイ

材料

- HeLa細胞
- DMEM
- FBS
- Hoechst33482
- 96-wellガラスボトムマルチウェルプレート（IWAKI）

観察・解析環境

- 顕微鏡：Eclipse Ti2-E
- 対物レンズ：CFI プランアポクロマート Lambda D 2X、CFI プランアポクロマート Lambda D 20X, CFI プランフルオール 4X
- CMOSカメラ：DS50M、他社製品A
- ソフトウェア：NIS-Elements AR v5.42.01

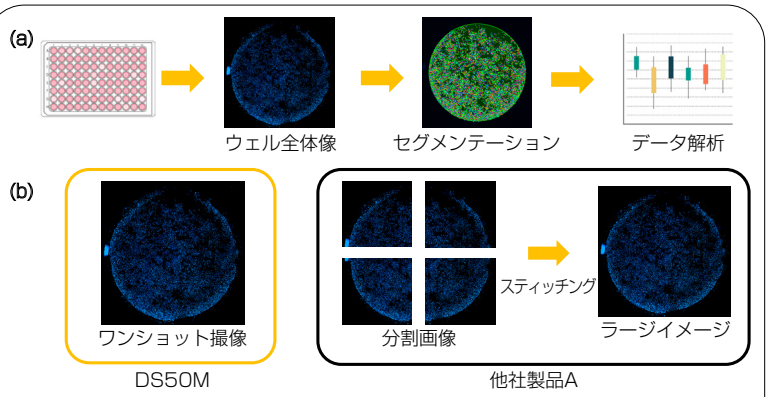


図1．DS50Mによりウェル全体像を一度に取得
(a) ウェル全体像による定量解析のフロー
(b) DS50Mはφ6.5 mmのウェル全体を、定量解析に利用可能な解像度で一度に撮像できる(左)。他社製品Aは分割して画像を取得し、一枚の画像に合成する必要がある(右)。

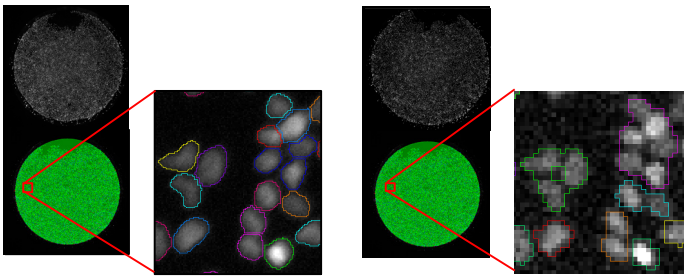
(a)

	DS50M	他社製品A
記録画素数 [画素]	9552 x 6360	2048 x 2048
撮像素子サイズ [mm]	35.8 x 23.8	13.3 x 13.3
画素サイズ [µm]	3.76	6.5

(b)

	DS50M 2x	他社製品A 2x
対物レンズ	CFI Plan Apo Lambda D 2X	
リレーレンズ	1.8x	1x
光学分解能/画素サイズ	2.63	0.85

(c)

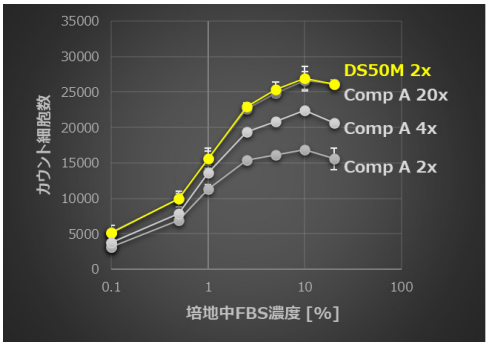


DS50M
Fマウントアダプター 1.8X
CFI プランアポクロマート Lambda D 2X

他社製品A
CFIプランアポクロマート Lambda D 2X

図2．高解像度のウェル全体像からの核セグメンテーション
(a) DS50Mと他社製品Aの撮像素子のスペック。
(b) ウェル全体像の撮像に使用した対物レンズ、リレーレンズ倍率、およびピクセルピッチと空間周波数の比を示している。DS50Mはナイキストの条件(>2)を満たしている。
(c) 各カメラ、リレーレンズ、対物レンズの条件で撮像されたウェル全体像からの、核セグメンテーションを比較。セグメンテーションはNIS-Elementsを用いて行った。各条件において、上の画像は解析前のモノクロ画像、下の画像は解析後の画像であり、緑の領域はウェルの範囲を示している。右の画像は拡大図を示しており、認識された区画にそれぞれ異なる色でアノテーションを行った。

(a)



(b)

	DS50M 2x	他社製品A 2x
基準に対する比率* [%]	101.1±8.6	63.5±8.9

*他社カメラAと CFI プランフルオール 20X で撮影した画像を基準とする。

(c)

	DS50M 2x	他社製品A 20x	他社製品A 2x
Z-factor	0.89	0.83	0.62

(d)

	DS50M 2x	他社製品A 4x
96ウェルの撮像時間	10分 36秒	15分 18秒

図3. 核数の定量化

(a) 異なるFBS濃度で48時間培養し、異なるカメラと対物レンズで撮像、解析を行った結果。y軸はカウントされた核数、x軸は培養に用いた培地のFBS濃度を対数軸で示している。DS50M 2x：DS50M + 対物レンズCFI プランアポクロマート Lambda D 2X、Comp A 2x：他社カメラA + 対物レンズCFI プランアポクロマート Lambda D 2X、Comp A 4x：他社カメラA +対物レンズCFI プランフルオール 4X、Comp A 20x：他社カメラA +対物レンズCFI プランアポクロマート Lambda D 20X

(b) 各カメラで撮像した画像の解析結果によりカウントされた核定量結果。基準となる条件に対する比を示した。

(c) 各撮像条件におけるZ factor。計算方法としては $Z\ \text{factor} = 1 - \frac{3(SD_{max} + SD_{min})}{|Ave_{max} - Ave_{min}|}$ を用いた。

(d) 各撮像条件において96ウェルを撮像したと仮定した場合の所要時間。

方法

・細胞培養

HeLa細胞を96-wellガラスボトムマルチウェルプレート（IWAKI）に1x10^4播種し、24時間後にFBS濃度を20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1, 0%で調整したDMEM培地に交換した。その後、48時間培養した。

・画像解析

細胞を4%PFAを含むPBSで固定し、1ug/ml Hoechst33482を含むPBSで30分間染色した。顕微鏡は倒立顕微鏡Ti2-E（Nikon）およびDAPI用蛍光フィルターキューブを用い、対物レンズはCFI プランアポクロマート Lambda D 2X、CFI プランフルオール 4X、CFI プランアポクロマート Lambda D 20X、カメラはDS50Mと他社製品Aを用いて蛍光シグナルを取得した。2倍の対物レンズを使用した場合はウェル全体像を一度に取得し、4倍および20倍の対物レンズを使用した場合はスティッチングによりウェル全体像を取得した（図1 b）。ウェル全体像の解析はNIS-Elementsの解析機能を用いてウェル範囲の指定とセグメンテーションを行い、核の数を定量した。

結果

DS50Mは他社製品Aの4倍の画素数を持ち、かつ画素サイズのより細かいフルサイズの撮像素子を搭載したカメラである（図2 a）。DS50Mは低倍のCFI プランアポクロマート Lambda D 2X対物レンズを用いた場合に、計算上ではナイキストの条件を満たしており、低倍レンズを使用しても高解像度で撮像できることを示している（図2 b）。これらのカメラで得られた、ウェル内のHeLa細胞の核のHoechst33482染色像を示す（図2 c）。他社製品Aは低倍レンズではナイキストの条件を満たさず、解像度が不足しているためにブロックノイズにより核の形状がつぶれてしまっている。一方で、DS50Mでは核の形状が滑らかに表現されている。各カメラのデータを用いてセグメンテーションを行うと、他社製品Aは複数の核が同一の物体とみなされているのに対し、DS50Mではそれぞれの核が認識されている。このことから、DS50Mは形態解析において十分な解像度を有するため、本アッセイ系において有用性があることが示唆された。

次に形態解析における定量性を評価するために、異なるFBS濃度で培養した細胞の核数を定量し、その正確さを比較した（図3 a）。他社製品AとCFI プランフルオール 20Xで取得したウェル全体像の画像解析から得られた核数を正解値とし、それぞれのカメラと低倍対物レンズによって得たウェル全体像の解析結果を評価した。その結果、他社製品Aの定量結果は正解値に対する比率が63.5±8.9%程度であったのに対し、DS50Mは101.1±8.6%であり正解値に近い値を示した（図3 b）。アッセイ系の品質指標であるZ-factorを計算した結果、低倍レンズを用いたDS50MのZ-factorは0.89であり、他社製品Aと2倍レンズのZ-factorは0.62であった。他社製品Aと高倍率の20倍レンズのZ-factorは0.88であった（図3 c）。これらの結果より、DS50Mと低倍レンズで取得した画像は核定量において、高倍率レンズで取得した画像と同等の性能を有することが示された。また、96ウェルを撮像するための所要時間は、DS50Mと2倍対物レンズを使用した場合は10分 36秒であり、他社製品Aと4倍対物レンズを使用した場合は15分 18秒であった（図3 d）。他社製品Aは、十分な解像度のウェル全体像を得るためには4倍対物レンズで撮像した後に、分割した画像のスティッチングが必要である。一方、DS50Mはワンショットでウェル全体像を撮像できるため高速な取得が可能である。

考察/まとめ

高画素数のフルサイズモノクロイメージセンサー搭載のDS50Mカメラは、優れた光学特性をもつCFI プランアポクロマート Lambda D 2X対物レンズとの併用により、96-wellマルチウェルプレートにおけるウェル全体像を高解像度でワンショット撮像できる。DS50Mによって得られた画像は、高倍率対物レンズで取得した画像と同等の高い核定量性を示した。さらに、ウェル全体で定量性のある画像を得るには、通常は20倍などの高倍対物レンズで画像取得し、スティッチングを行うことでウェル全体像を取得する必要があるため、96ウェルの取得には2h～3hほどかかってしまうのに対して、DS50Mはワンショットで高解像度のウェル全体像を取得できるため、アッセイの高速化が可能である。

以上より、増殖能や核移行などを指標とする細胞を用いたスクリーニングにおいて、DS50Mは優れた定量性と高スループットでのアッセイを実現し、画像取得の効率化が求められる創薬アッセイにおいて有効なツールになり得ると考えられる。

製品情報

顕微鏡モノクロデジタルカメラ Digital Sight 50M

フルサイズセンサー搭載のFマウントモノクロカメラ。9552 x 6360画素、画素サイズ3.76 μmの撮像素子により、広視野・高解像の画像取得が可能。定量性とハイスループットを求められるアッセイ系において優れた結果を提供します。