

## APPLICATION NOTE

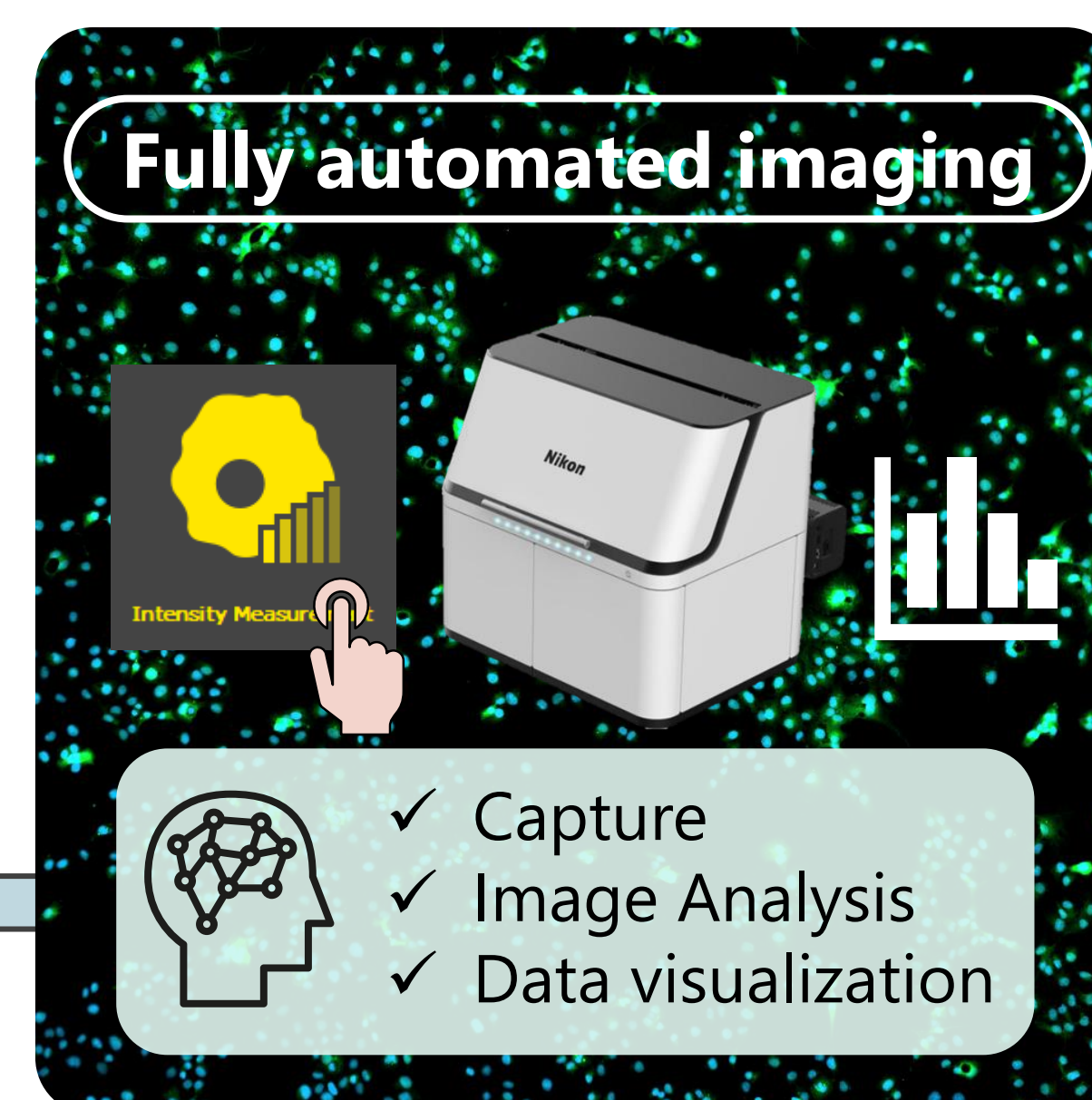
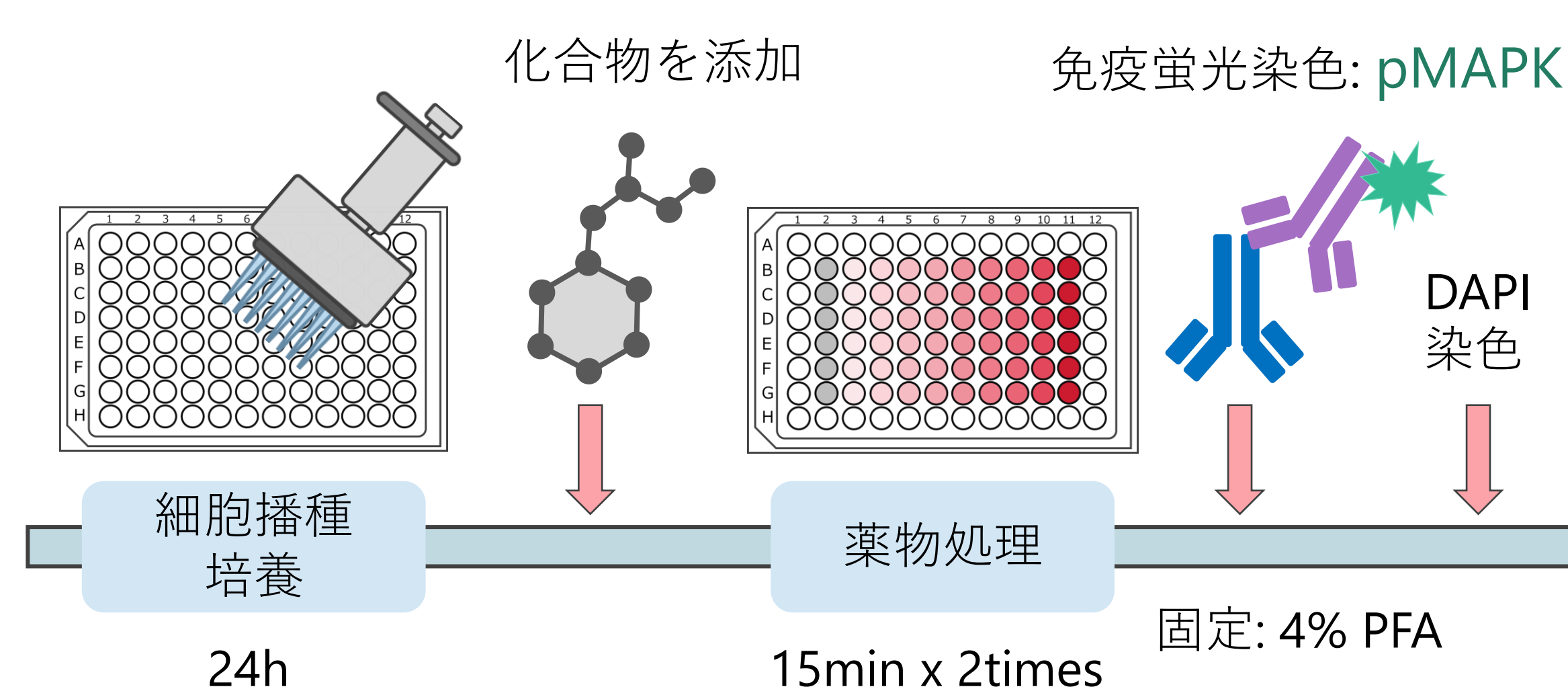
Smart Imaging System ECLIPSE Ji  
画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE  
Intensity Measurement

# 学習済みAIモデルを用いた明視野画像からのラベルフリー細胞領域の検出と細胞レベルでの蛍光強度の測定

ECLIPSE Ji は、画像統合ソフトウェアNIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得から解析、グラフ作成までシームレスに自動で実行できるSmart Experimentを搭載しています。事前に学習させたArtificial Intelligence (AI) と事前に定義されたイメージングプロセスが画像取得と解析条件の設定を自動的に最適化するため、簡単な操作で可視化されたデータやEC<sub>50</sub>の情報が得られます。蛍光強度の測定は、タンパク質や酵素活性の定量など、細胞生物学の基礎研究から創薬まで幅広い用途で活用されています。本アプリケーションノートでは、Smart ExperimentのIntensity Measurementモジュールを用いて、明視野画像からラベルフリーで細胞領域を検出し、細胞レベルで蛍光強度を測定する例を紹介します。また、pMAPK由来の用量依存的な蛍光強度の減少を自動的に可視化し、IC<sub>50</sub>を算出して薬物の効果を定量化する例を紹介します。

キーワード：蛍光強度、タンパク質の定量、創薬、抗がん剤の研究、自動設定、IC<sub>50</sub>、用量反応曲線

### 実験の概要



#### ● Key features

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成まで自動で実行
- ✓ 蛍光強度の測定
- ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ 用量反応曲線を自動で作成
- ✓ EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>を自動で算出
- ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 96ウェルプレートにCOS7細胞を播種し、24時間培養。(2) 被験物質のU0126を10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して15分間インキュベート。(3) 各試験濃度のU0126および10 ng/ml PMAを含む増殖培地に交換し、15分間インキュベート。(4) 4% PFAで細胞を固定。0.2% Triton X-100で膜透過処理。(5) Rabbit anti-pMAPK antibody (一次抗体) と Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (二次抗体) で蛍光免疫染色。DAPIで核を染色。(6) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Intensity Measurementアイコンを選択して自動で画像取得と解析を実施した。

検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)
全ての細胞の核	DAPI	345/455
細胞領域	None (Detect from brightfield image using AI)	Brightfield
ターゲット分子 (pMAPK)	Rabbit anti-pMAPK (primary), Goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor™ 488) (secondary)	495/519
倍率	視野 (FOV)	
10X	1.76 x 1.76 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

#### Point

#### Label-free

#### 学習済みのAI

AIが明視野画像から細胞領域を自動で識別

AIによる細胞領域の識別では、細胞領域の識別に追加の細胞膜染色は必要ありません。これにより、蛍光波長を蛍光タンパク質の検出に利用できるため、より幅広い実験が可能になります。

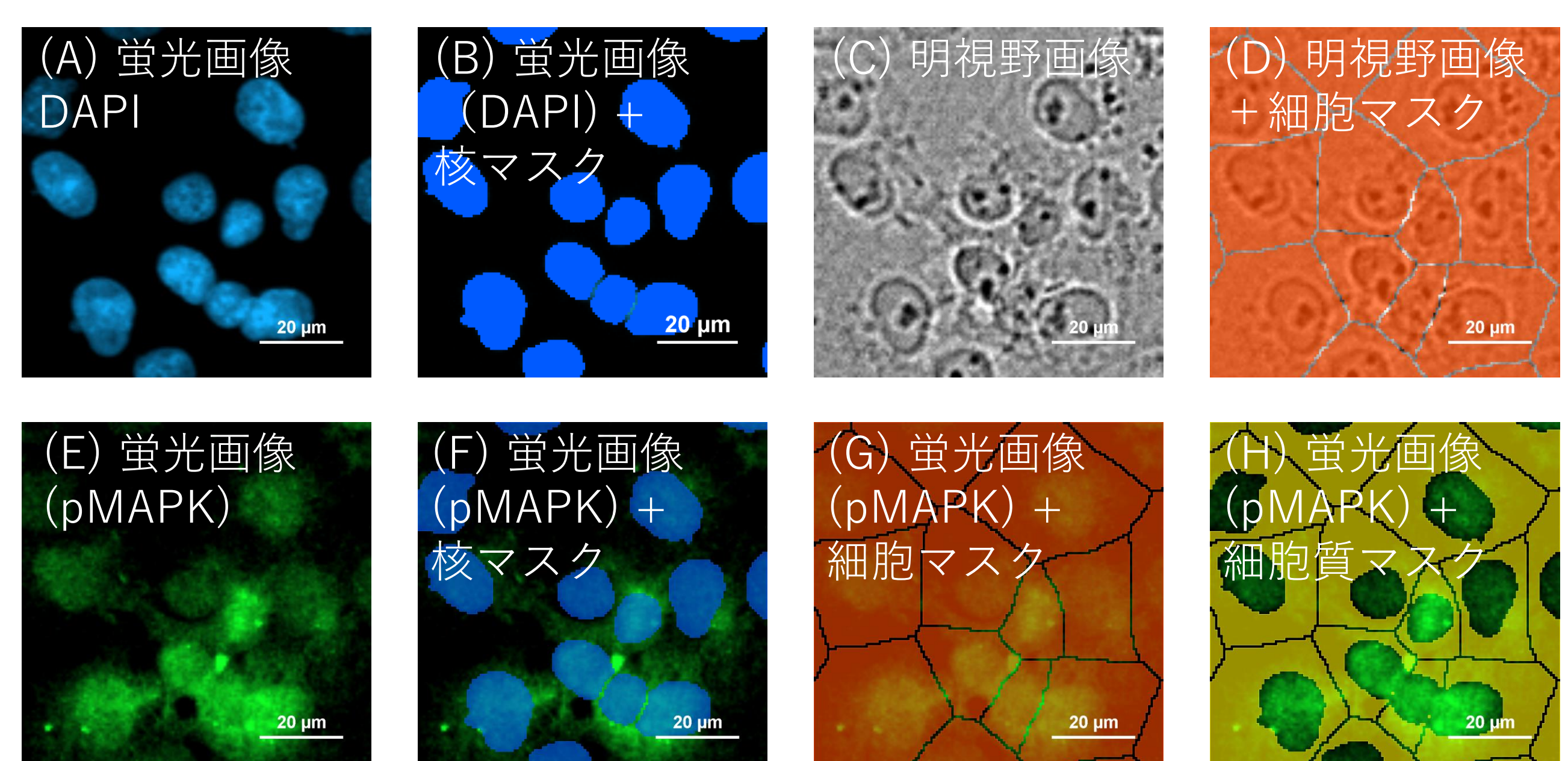


図1. 二値化の方法とターゲット分子の測定

DAPIで検出した核領域 (A) を二値化して核マスク (B) を作成。学習済みのAIが明視野画像 (C) から背景と細胞領域を識別。核マスク (B) を用いて細胞領域を分割して細胞マスク (D) を作成。細胞マスク (D) の領域から核マスク (B) の領域を減算し、細胞質マスク (H) を作成。蛍光画像 (E) から各マスク領域 (核、細胞、細胞質) における免疫蛍光染色したpMAPK由来の蛍光強度を測定し、ターゲットタンパク質の発現量を定量する (F、G、H)。

スケールバー：20 μm



結果

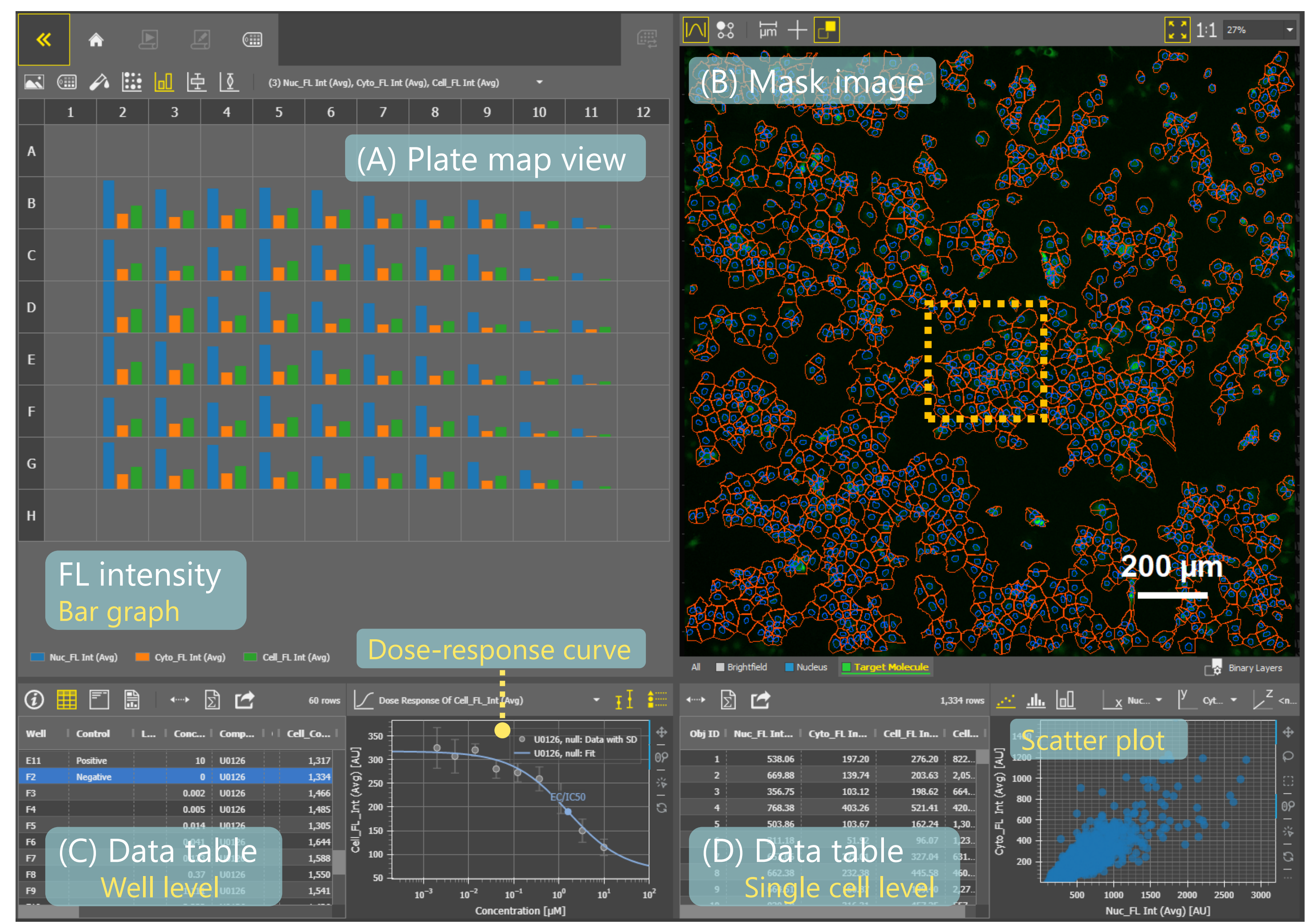


図2. 蛍光強度の解析結果、分析しやすいGUIを備えたソフトウェア

プレートマップビュー（A）では、ヒートマップ、棒グラフ、箱ひげ図、バイオリンプロットが表示でき、プレート全体の解析結果を直感的に確認できます。データテーブルからウェルレベル（C）とシングルセルレベル（D）の情報が得られます。用量反応曲線、散布図、ヒストグラム、棒グラフのグラフを表示できます。プレートマップビューの棒グラフ（A）は、核、細胞、細胞質の各マスク領域において、薬剤濃度依存的にpMAPK由来の平均蛍光強度が減少していることを示しています。本実験では、細胞マスク領域におけるpMAPK由来の蛍光強度に基づくIC<sub>50</sub>は、1.665でした。スケールバー：200 μm

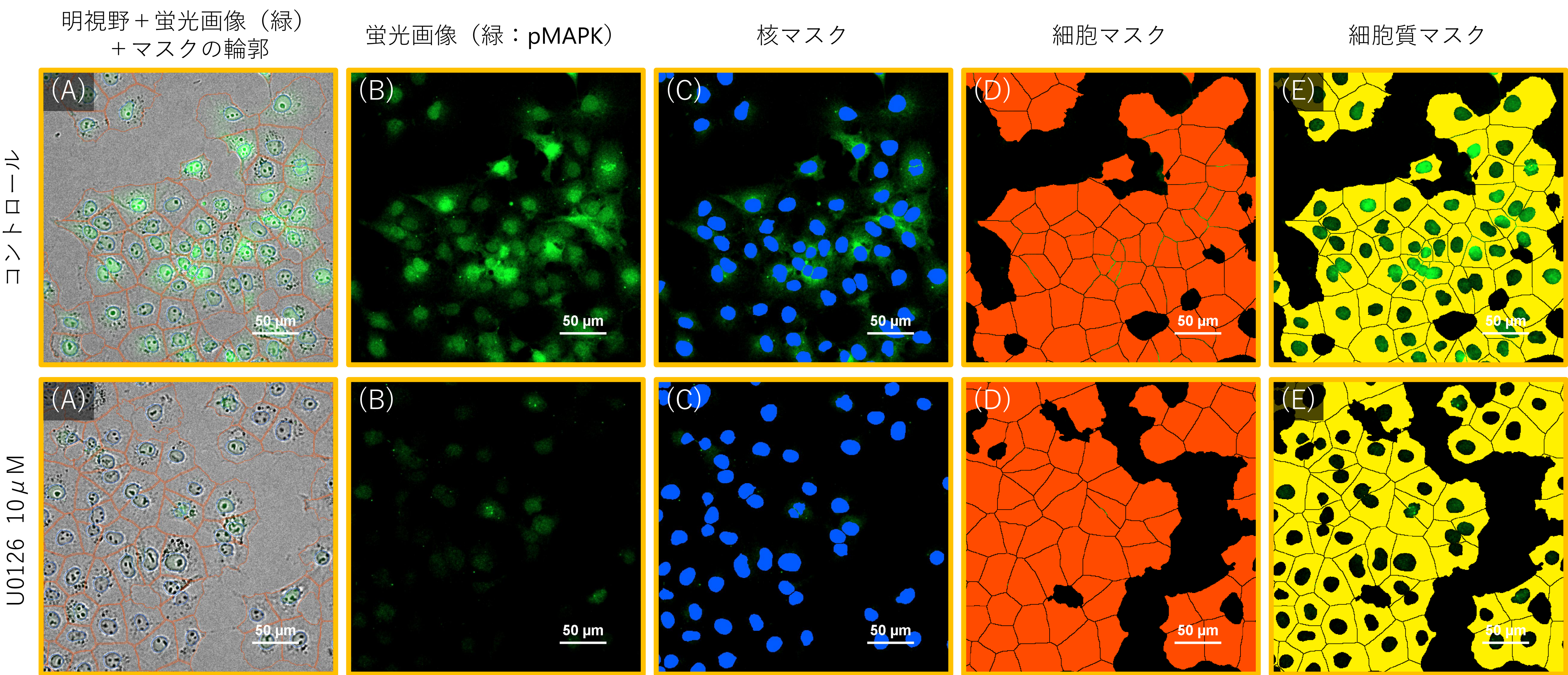


図3. コントロール（未処理）およびU0126で30分間処理したHeLa細胞の画像、蛍光画像にマスクを重ね合わせた画像  
画像ファイルをアドバンスドモードで開き、図2のオレンジ色の点線枠（0.31mm×0.31mm）の範囲を切り取った拡大画像、上段：コントロール（未処理）、下段：U0126 10 μMで24時間処理、（A）明視野と蛍光（緑：pMAPK）のマージ画像にマスクの輪郭（青：核マスク、赤：細胞マスク）を重ねた画像、（B）pMAPKの免疫蛍光画像、（C-E）蛍光画像（緑：pMAPK）に各マスクを重ねた画像、（C）青：核マスク、（D）赤：細胞マスク、（E）黄色：細胞質マスク、スケールバー：50 μm

まとめ

- ✓ 学習済みのAIで明視野画像から細胞領域を自動で識別し、蛍光チャンネルから細胞マスク領域におけるpMAPK由来の平均蛍光強度を測定できました。
- ✓ U0126の用量依存的なpMAPK由来の蛍光強度の減少を確認することができました。
- ✓ Smart Experimentは、画像の取得から解析、グラフ作成まで全自動で実施できます。
- ✓ 用量反応曲線が自動で作成され、IC<sub>50</sub>を算出できます。
- ✓ ウェルプレートにJiに設置して、Intensity Measurementのアイコンを選択し、サンプルの情報を入力するシンプルな操作です。今回の実験条件では、撮影開始からグラフ表示まで約20分で実施できました。

- ✓ CellFinder.aiが最適な焦点面を見つけるため、面倒なオートフォーカスの設定は必要ありません。
- ✓ 面倒な設定は、AIに任せて研究者はより創造的な研究活動に専念できます。

サンプル作成のプロトコル

- 1) COS7細胞を96ウェルプレートに1x10<sup>4</sup> cells/wellの密度で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養する。
- 2) U0126を0, 0.002, 0.005, 0.014, 0.041, 0.123, 0.370, 1.111, 3.333, および 10 μM の濃度に培地で希釈した前処理培地を各6ウェルに添加する。細胞を15分間、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で処理する。



- 3) 前処理培地を除去し、本処理培地（各試験濃度のU0126および10 ng/ml PMAを含む増殖培地）を各6ウェルに添加する。細胞を15分間、 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で処理する。
- 4) 4% PFAをウェルに添加し、室温で10分間静置して細胞を固定する。
- 5) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 6) 0.2% Triton X-100 in PBSをウェルに添加し、室温で15分間静置して膜透過処理をする。
- 7) 細胞をPBSで3回洗浄する。

材料と試薬

細胞培養													
細胞	COS7 (RIKEN RCB0539)												
増殖培地	DMEM (Low Glucose) + 10%FBS + 1%Pc/Sm												
培養容器	EZVIEW® Culture Plate B (Glass Bottom Plate) Microplate 96 well (AGC techno glass (IWAKI), 5866-096)												
被験物質													
化合物	U0126												
試験濃度	Negative control: 0 μM Positive control: 10 μM To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: Ex: (0) 0 μM, (1) 0.002 μM, (2) 0.005 μM, (3) 0.014 μM, (4) 0.041 μM, (5) 0.123 μM, (6) 0.370 μM, (7) 1.111 μM, (8) 3.333 μM, (9) 10 μM												
プレート マップの例		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
	B	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	C	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	D	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	E	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	F	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	G	b	(0)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	b
	H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
“b” : blank well													

対応容器\*

- ・ 24, 48, 96 ウェルプレート

\* ガラスおよびポリスチレン底のウェルプレートに対応しています。画質を優先する場合は、ガラス底のウェルプレートを使用してください。

- 8) 3% BSA in PBSでブロッキングし、室温で30分静置する。
- 9) ブロッキング液で希釈した一次抗体（1: 200）を添加したPBSに置換し、室温で2時間静置する。
- 10) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 11) ブロッキング液で希釈した二次抗体（1：500）を添加したPBSに置換し、室温で1時間静置する。
- 12) 細胞をPBSで3回洗浄する。
- 13) DAPI (終濃度2 μg/ml)をウェルに添加し、室温で5分間静置する。
- 14) 細胞をPBSで3回洗浄する。

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
U0126, Selective MKK inhibitor	ab120241	Abcam
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (primary antibody)	4370	Cell Signaling Technology
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	A-11008	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™
DAPI Solution	62248	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco’s modified Eagle’s Medium (DMEM)	11885084	Thermo Fisher Scientific
Fetal bovine serum (FBS)	10437028	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (Pc/Sm) (10,000 U/ml)	15140122	Thermo Fisher Scientific
16%-Paraformaldehyde Aqueous Solution (16% PFA) *Dilute by 4% with PBS before use	11850-14	Nacalai Tesque
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	P8139	Sigma-Aldrich

参考文献

Favata, MF, et al., Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase *Journal of Biological Chemistry* **273** 18623-18632 (1998)

製品情報

Smart Imaging System ECLIPSE Ji

ECLIPSE Jiは、AI-Driven全自動イメージングシステムです。NIS-Elements SEと組み合わせて使用することで、画像取得・解析・グラフ作成をシームレスに自動で実行できます。人による高度な判断が必要なオートフォーカスの設定にはAIが最適な焦点面を見つけるCellFinder.aiを搭載。画像取得や解析のプロセスに多くの学習済みAIを実装。これにより、設定や最適化の工程数が大幅に削減され、誰もが簡単に結果を得ることができます。



画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE SmartExperiment Basic Set Intensity Measurement

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 核、細胞、細胞質領域の蛍光強度を全自動で簡単に解析できます。
- ✓ ワンクリックでレポートを作成し、画像、解析結果、用量反応曲線、 EC<sub>50</sub> /IC<sub>50</sub>の算出結果をPDFで出力できます。
- ✓ 細胞イメージングと解析をより簡単に、より快適に