



APPLICATION NOTE

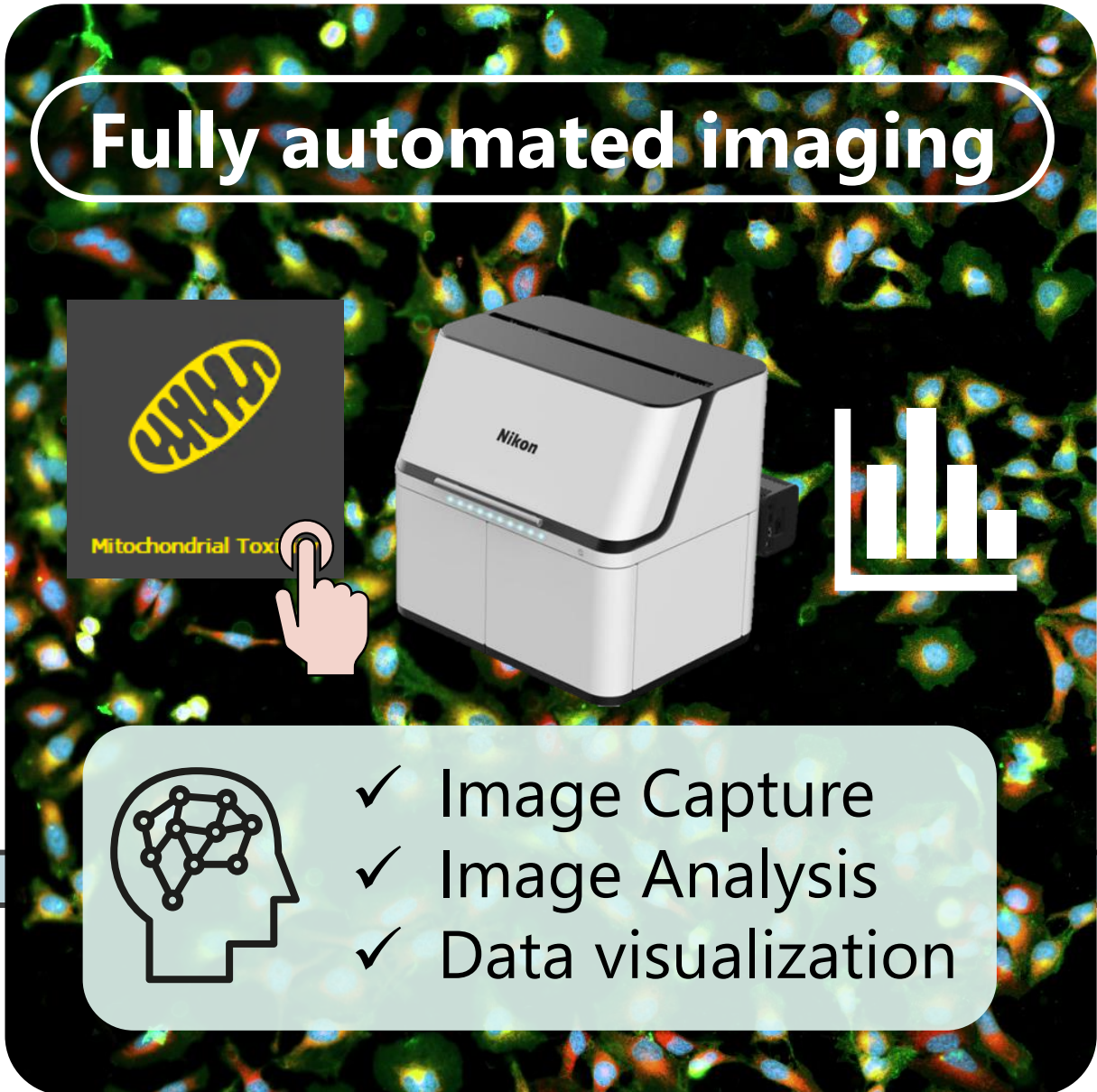
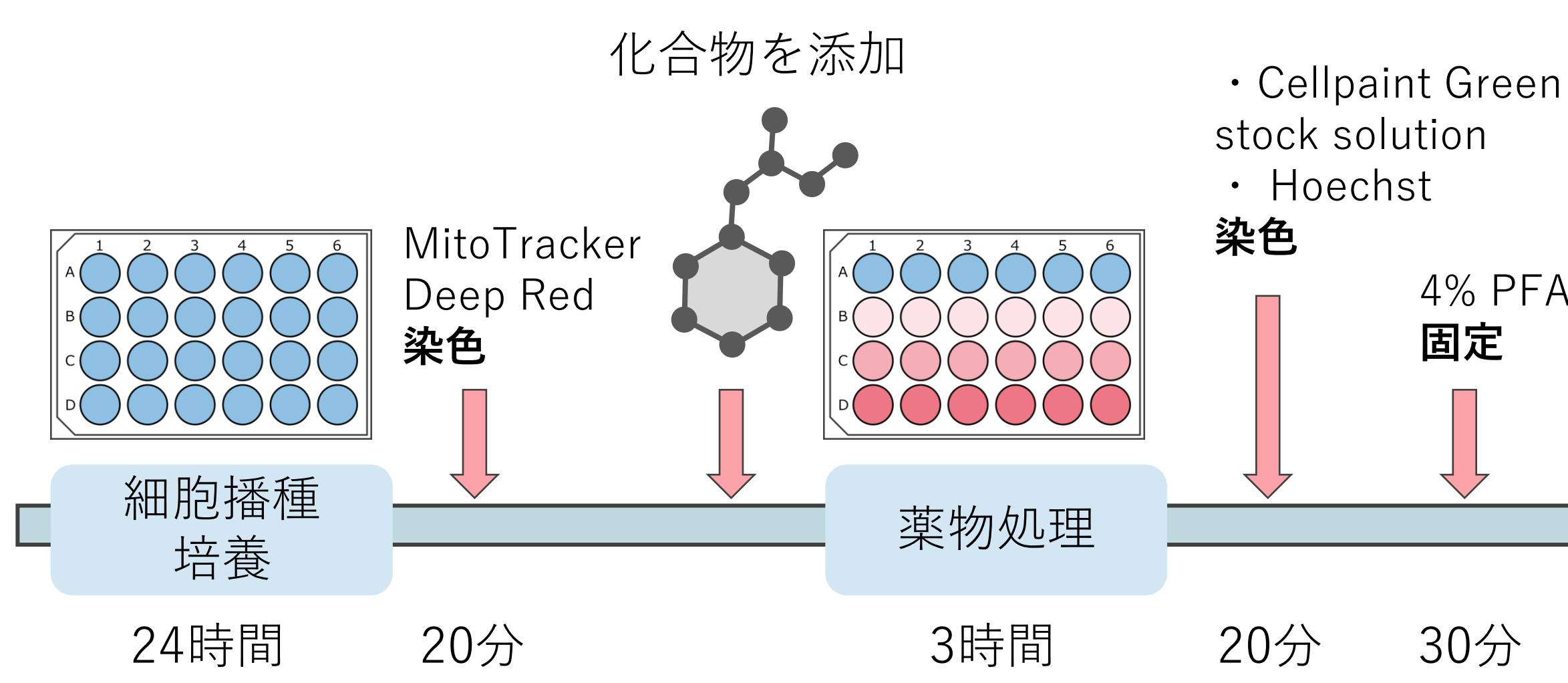
Smart Imaging System ECLIPSE Ji
画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
Mitochondrial Toxicity (Option)

AI-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いたミトコンドリア毒性の解析

ミトコンドリアは、エネルギーを生産する重要なオルガネラです。ミトコンドリアの機能不全は、代謝異常やあらゆる疾患の発症に関与していることが知られています。ミトコンドリア膜電位依存性蛍光色素は、ミトコンドリアの健康に関する独自の洞察を提供します。NIS-Elements Smart Experiment (SE) ソフトウェアを搭載した ECLIPSE Ji デジタル倒立顕微鏡は、画像取得から解析、データの視覚化までの自動化されたシームレスなイメージング ワークフローを可能にします。本アプリケーションノートでは、 Mitochondrial Toxicityモジュールを使用して、健康なミトコンドリアを染色する色素の蛍光強度を測定することにより、薬物によるミトコンドリアの毒性を解析した例を紹介します。

キーワード：ミトコンドリア毒性、毒性学、毒性試験、毒性評価、薬理試験、創薬

実験の概要



- Key features
 - ✓ 画像の取得から解析、グラフ作成までシームレスに実行
 - ✓ ミトコンドリア毒性を定量化
 - ✓ 薬物の反応を簡単に定量化
 - ✓ Z'-factorを自動で算出

(1) 24ウェルプレートにHeLa細胞を播種し、24時間培養。(2) MitoTracker™ Deep Red (終濃度：1 μM)を含む増殖培地に置換して20分インキュベート。(3) 被験物質のFCCPを0μM, 25μM, 50μMおよび100μMの濃度に調整し、各ウェルに添加して3時間インキュベート。(4) 染色液 (Cellpaint Green stock solution (2μl/mL) + Hoechst (2μg/mL))に交換し、20分インキュベート。(5) 4% PFAで細胞を固定。(6) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Mitochondrial Toxicity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	Hoechst 33342	350/461
細胞領域	Cell Navigator® Cell Plasma Membrane Staining Kit *Green Fluorescence*	497/505
健康なミトコンドリア	MitoTracker™ Deep Red FM - Special Packaging	644/665
倍率	視野 (FOV)	
20X	0.88 x 0.88 mm	

表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

結果と考察

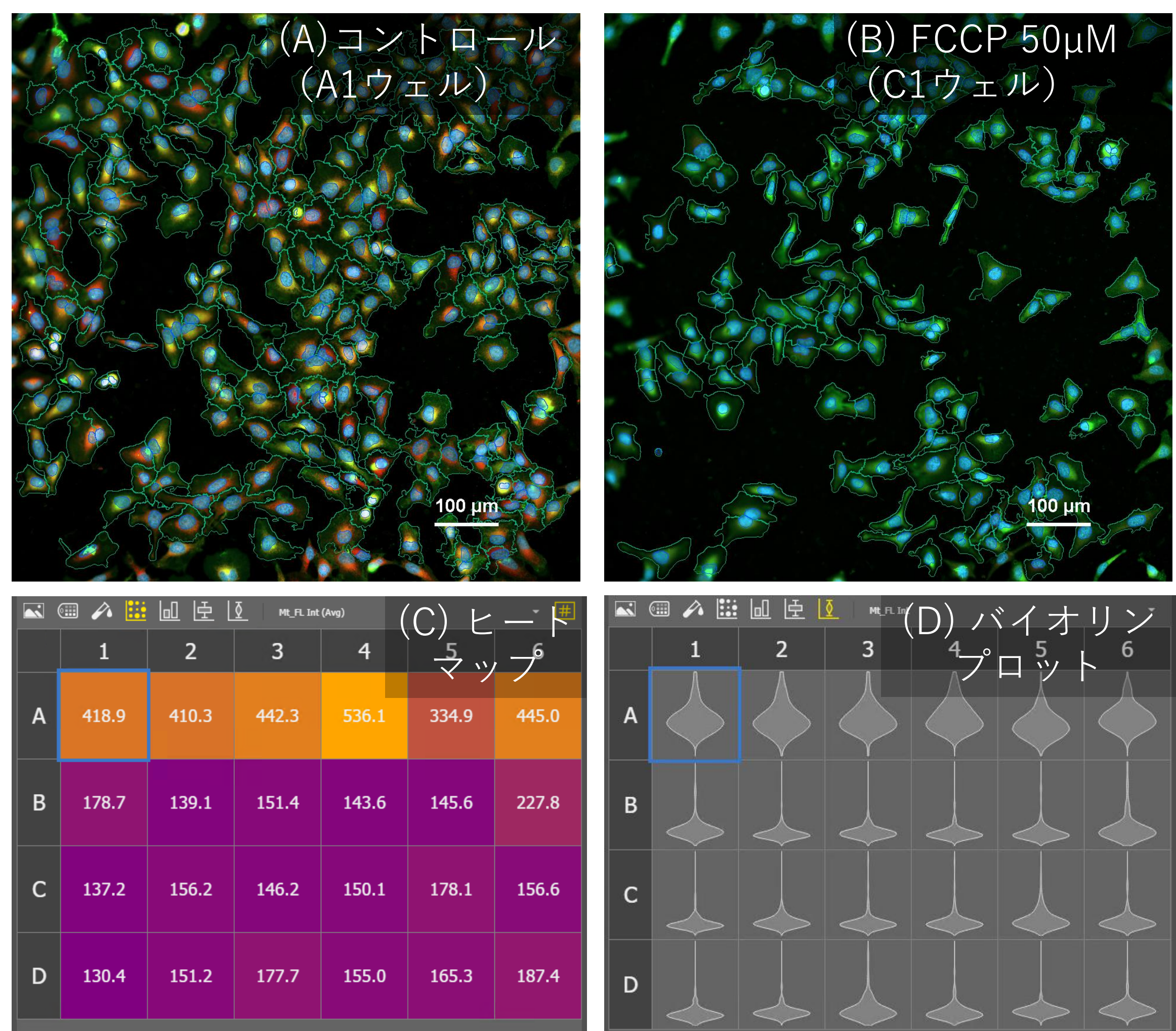


図1. 二値化の方法とMitoTracker™ Deep Red FMの蛍光強度測定
Hoechst 33342で検出した核領域から核マスクを作成。Cell Navigator® Cell Plasma Membraneで検出した細胞領域から細胞マスクを作成。細胞マスク領域におけるMitoTracker™ Deep Red FM由来の健康なミトコンドリアの蛍光強度を測定した。
(A, B) HeLa細胞の蛍光画像にマスクの輪郭をオーバーレイした画像（青：DAPI、緑： Cell Navigator® Cell Plasma Membrane、赤： MitoTracker™ Deep Red FM、青色マスク：核、緑色マスク：細胞マスク）、スケールバー：100μm
(C, D) 各ウェルの細胞あたりの MitoTracker™ Deep Red FM の平均蛍光強度の分析。FCCPの濃度は、ウェルプレートマップの上から 順に0 μM, 25 μM, 50 μM, 100μM。FCCPの濃度が25μM以上のウェルではMitoTracker™ Deep Red FMの蛍光強度が減少しました。これは、FCCP が MitoTracker™ Deep Red FM で標識できる健康なミトコンドリアの数を減少させることを示しています。

まとめ

- ✓ 蛍光により検出される細胞マスクの領域における MitoTracker™ Deep Red FMの平均蛍光強度を測定しました。
- ✓ MitoTracker™ Deep Red FM の平均蛍光強度は、25μM 以上の濃度のFCCP で処理したウェルでは減少しました。
- ✓ 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。

材料と試薬

細胞培養							
細胞	HeLa (RIKEN RCB0007)						
増殖培地	MEM + 10%FBS + 1%Pc/Sm						
培養容器	EZVIEW® Culture Plate LB (Glass Bottom Plate) Microplate 24 well (AGC techno glass (IWAKI), 5826-024)						
被験物質							
化合物	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine (FCCP)						
試験濃度	Negative control: 0μM Positive control: 50μM A: 0μM, B: 25μM, C: 50μM, D: 100μM						
プレートマップの例		1	2	3	4	5	6
	A	0	0	0	0	0	0
	B	25	25	25	25	25	25
	C	50	50	50	50	50	50
	D	100	100	100	100	100	100
	Unit : μM						

- 対応容器*
- ・ 24, 96-well plate
- * ガラス底のウェルプレートにのみ対応しています。

- ✓ ウェルプレートにJiを設置して、Mitochondrial Toxicity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。
- ✓ 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。

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
FCCP	0453	R&D Systems, Inc.
MitoTracker™ Deep Red FM - Special Packaging	M22426	Thermo Fisher Scientific
Cell Navigator® Cell Plasma Membrane Staining Kit *Green Fluorescence*	22682	AAT Bioquest
Hoechst 33342 Solution(1mg/mL)	19172-51	Nacalai Tesque
MEM (Minimum Essential Medium)	11095080	Gibco™
Fetal Bovine Serum (FBS)	10437028	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (Pc/Sm) (10,000 U/mL)	15240122	Thermo Fisher Scientific
16%-Paraformaldehyde Aqueous Solution (16% PFA) *Dilute by 4% with PBS before use	11850-14	Nacalai Tesque
DPBS, no calcium, no magnesium (PBS (-))	14190144	Gibco™

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 Mitochondrial Toxicity（Option）

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 細胞領域における蛍光色素で標識したMitoTracker™ Deep Red FM由来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、解析結果をPDFで出力できます。

