

APPLICATION NOTE

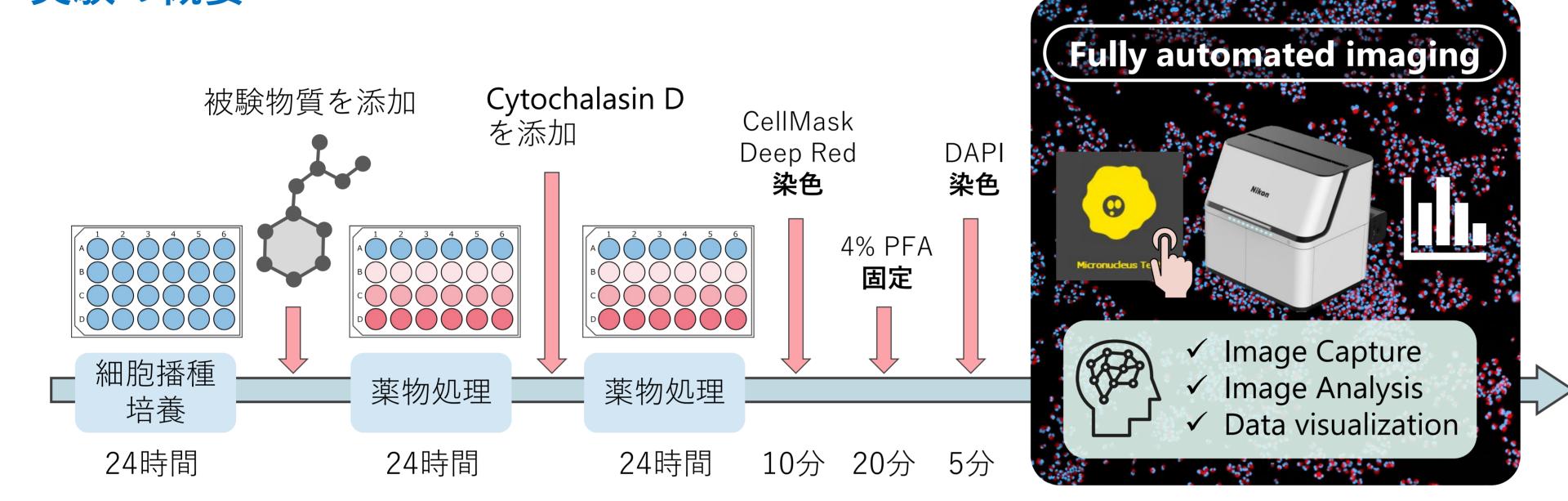
Smart Imaging System ECLIPSE Ji 画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE Micronucleus Test (Option)

Al-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いて小核を持つ細胞の割合を算出

遺伝毒性を有する物質は、染色体異常を誘発し、細胞分裂時に小核を形成することが知られています。小核試験は、染 色体異常により形成された小核を指標にした遺伝毒性の試験方法です。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、遺伝毒性を有するMitomycin Cで 細胞を処理し、小核試験モジュールを使用して小核を有する細胞の割合を算出する例を紹介します。

キーワード:遺伝毒性、毒性学、毒性試験、毒性評価、安全性試験、薬理試験、創薬

実験の概要



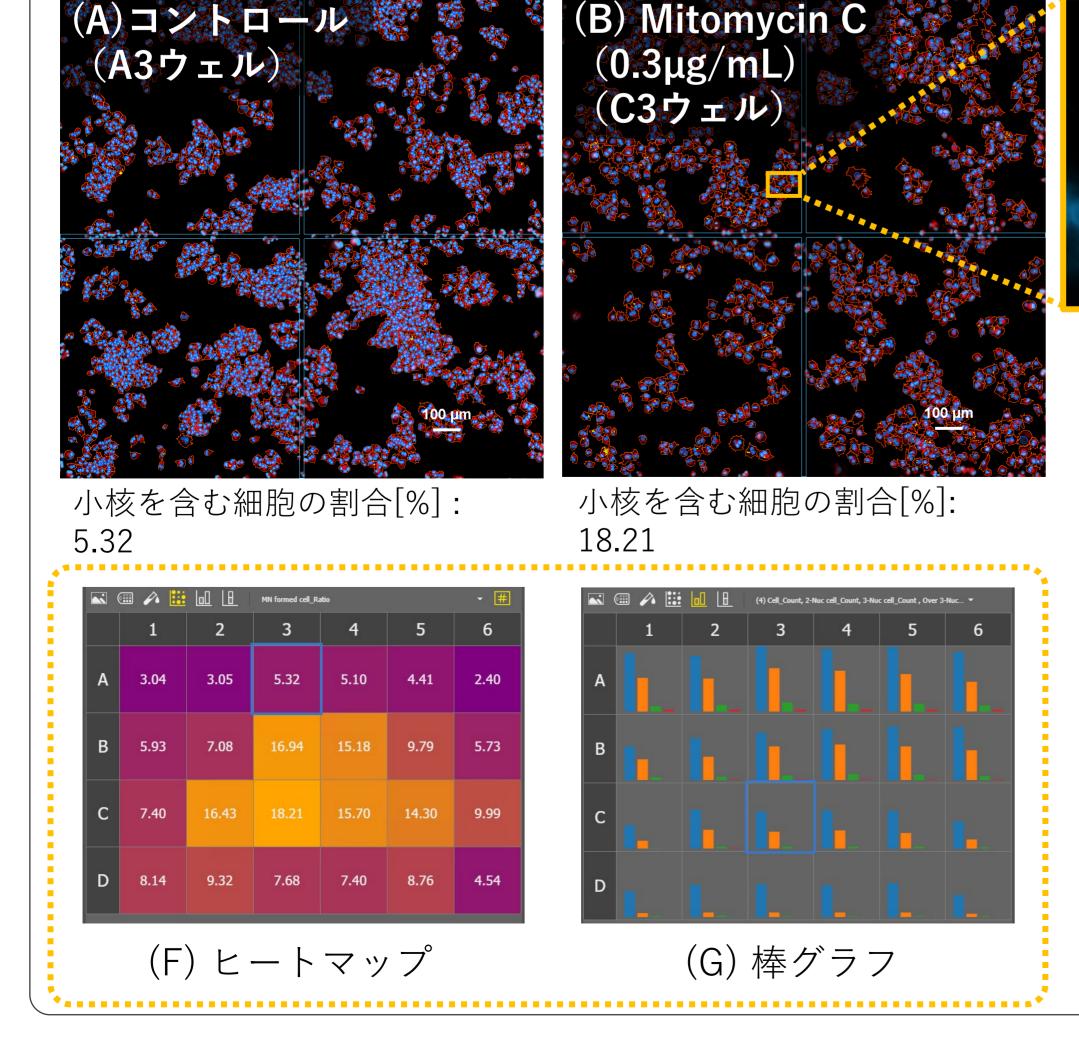
- Key features
- ✔ 画像の取得から解析、グラフ 作成までシームレスに実行
- ✔ 小核の形成率を定量化
- ✔ 薬物の反応を簡単に定量化
- ✓ Z'-factorを自動で算出

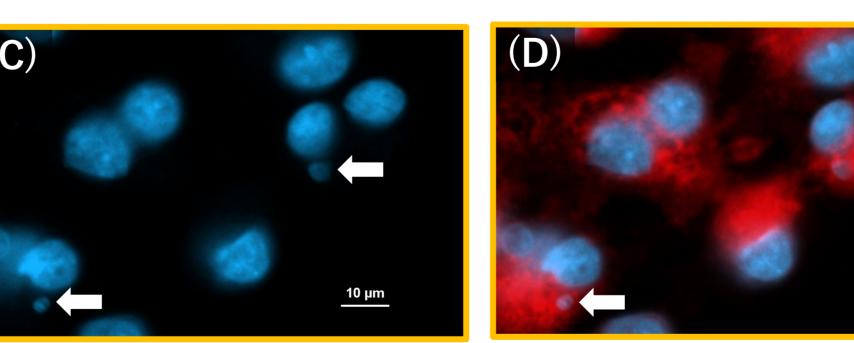
(1) 24ウェルプレートにCHO-K1細胞を播種し、24時間培養。(2) 被験 物質のMitomycin Cを0μg/mL, 0.1μg/mL, 0.3μg/mL および1μg/mLの 濃度に調整し、各ウェルに添加して24時間インキュベート。(3) Cytochalasin D(終濃度:6μM)を添加した増殖培地に培地を交換して、 24時間インキュベート。 (4) CellMask Deep Red (終濃度: 5 μg/mL) を添加し、10分インキュベート。(5) 4% PFAで細胞を固定。(6) DAPI (終濃度: $2\mu g/mL$)で核を染色。(7) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設 置し、Micronucleus Testアイコンを選択して自動で画像取得と解析を 実施した。

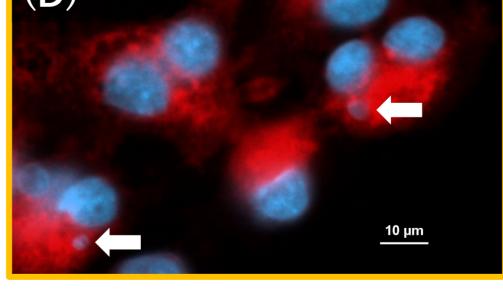
検出領域	蛍光ラベル	Ex/Em (nm)			
全ての細胞の核 と小核	DAPI	341/452			
細胞領域	CellMask TM Deep Red	649/666			
倍率	視野(FOV)				
20X	0.88 x 0.88 mm タイリング画像 (2X2) FOV: 1.75 x 1.75 mm				

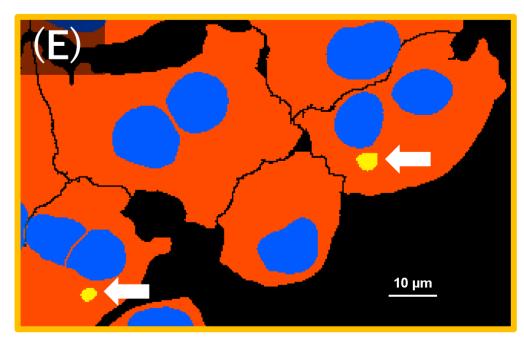
表1. 検出領域と蛍光ラベル、画像取得の条件

結果









DAPI

DAPI + CellMaskTM Deep Red

マスク画像

図1. 二値化の方法と小核を形成した細胞の割合の算出

(A.B) CHO-K1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、スケール バー:100μm、(C, D, E) Bの黄色四角枠部分を拡大した蛍光画像とマスク画像、白矢 印:小核、スケールバー:10μm、(E) DAPIで検出した核領域から核マスク(青)と小 核マスク(黄色)を作成。CellMaskTM Deep Redで検出した細胞領域から細胞マスク (赤)を作成(F)全ての細胞数に対する小核を持つ細胞数の割合をヒートマップで表示、 Mitomycin Cを添加したウェルでは、 A列のコントロールウェルと比較して、小核を有 する細胞の割合が高い結果が得られた。(G)サイトカラシンDで細胞分裂を阻害し、多 核を形成した細胞の数をウェルごとに表示した棒グラフ(青:全細胞数、オレンジ:2 核の細胞数、緑:3核の細胞数、赤:4核以上の細胞数)

まとめ

- ✓ 全細胞数に対する小核を有する細胞数の割合を算出 できました。
- ✓ Mitomycin Cを添加しないコントロールに比べ、 Mitomycin Cを添加したウェルでは小核を有する細 胞数の割合が高いことが確認されました。
- ✓ 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。
- ✓ ウェルプレートをJiに設置して、Micronucleus Test 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。

材料と試薬

細胞培養								
細胞	CHO-K1 (JCRB9018)							
増殖培地	Ham's F-12 + 10% hi-FBS							
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	Mitomycin C (MMC)							
試験濃度	Negative control: 0μg/mL Positive control: 1μg/mL A: 0μg/mL, B: 0.1μg/mL, C: 0.3μg/mL, D: 1μg/mL							
		1	2	3	4	5	6	
	Α	0	0	0	0	0	0	
プレートマップの	В	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
マッフの	С	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
	D	1	1	1	1	1	1	
	Unit :μg/mL							

口 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。

試薬					
製品名	カタログ番号	メーカー名			
Mitomycin C (MMC)	M4287	Sigma-Aldrich			
Cytochalasin D	C8273	Sigma-Aldrich			
CellMask TM Deep Red Plasma Membrane Stain	C10046	Thermo Fisher Scientific			
DAPI Solution (1mg/mL)	62248	Thermo Fisher Scientific			
Ham's F-12 Nutrient Mix	11765054	Gibco TM			
Fetal Bovine Serum (FBS)	172012	Sigma-Aldrich			
CultureSure DMSO (DMSO)	031-24051	Fujifilm-Wako			
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 TM			
D-PBS (+) Preparation Reagent (Ca, Mg solution) (100x) (100x Ca, Mg solution)	02492-94	Nacalai Tesque			

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 Micronucleus Test (Option)

- ✔ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✔ 小核を持つ細胞数の割合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。