



APPLICATION NOTE

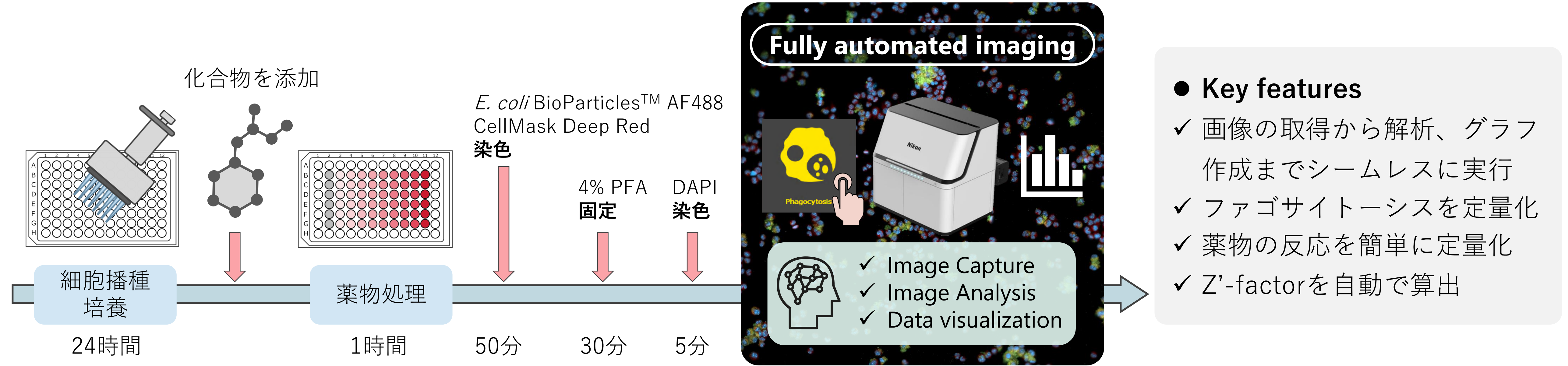
Smart Imaging System ECLIPSE Ji
画像統合ソフトウェアNIS-Elements SE
Phagocytosis (Option)

AI-driven 全自動スマートイメージングシステム ECLIPSE Jiを用いたファゴサイトーシスの解析

ファゴサイトーシスは、免疫細胞が死んだ細胞や細菌などの細胞外異物を細胞内に取り込み分解するプロセスです。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、Smart ExperimentのPhagocytosisモジュールを使用して、J774.1細胞に取り込まれた蛍光標識した大腸菌（K-12株）の蛍光強度と分布を測定することによりファゴサイトーシスの活性を定量した例を紹介します。

キーワード：免疫研究、食作用、薬理試験、創薬

実験の概要



(1) 96ウェルプレートにJ774.1細胞を播種し、24時間培養。(2) 被験物質のCytochalasin Dを10段階の濃度に調整し、各ウェルに添加して1時間インキュベート。(3) Cytochalasin Dを含む *E. coli* BioParticles™ AF488 (終濃度: 2.0x10⁶ BioParticles / well) およびCellMask Deep Red™ (終濃度5 µg/mL) を添加した培地で培地交換。50分間、インキュベート。(4) 4% PFAで細胞を固定。(5) DAPI (終濃度：2 µg/mL) で核を染色。(6) ウェルプレートをECLIPSE Jiに設置し、Phagocytosis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	360/460
Bioparticles	<i>Escherichia coli</i> (K-12 strain) BioParticles™, Alexa Fluor™ 488 conjugate	495/519
細胞領域	CellMask™ Deep Red	649/666
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

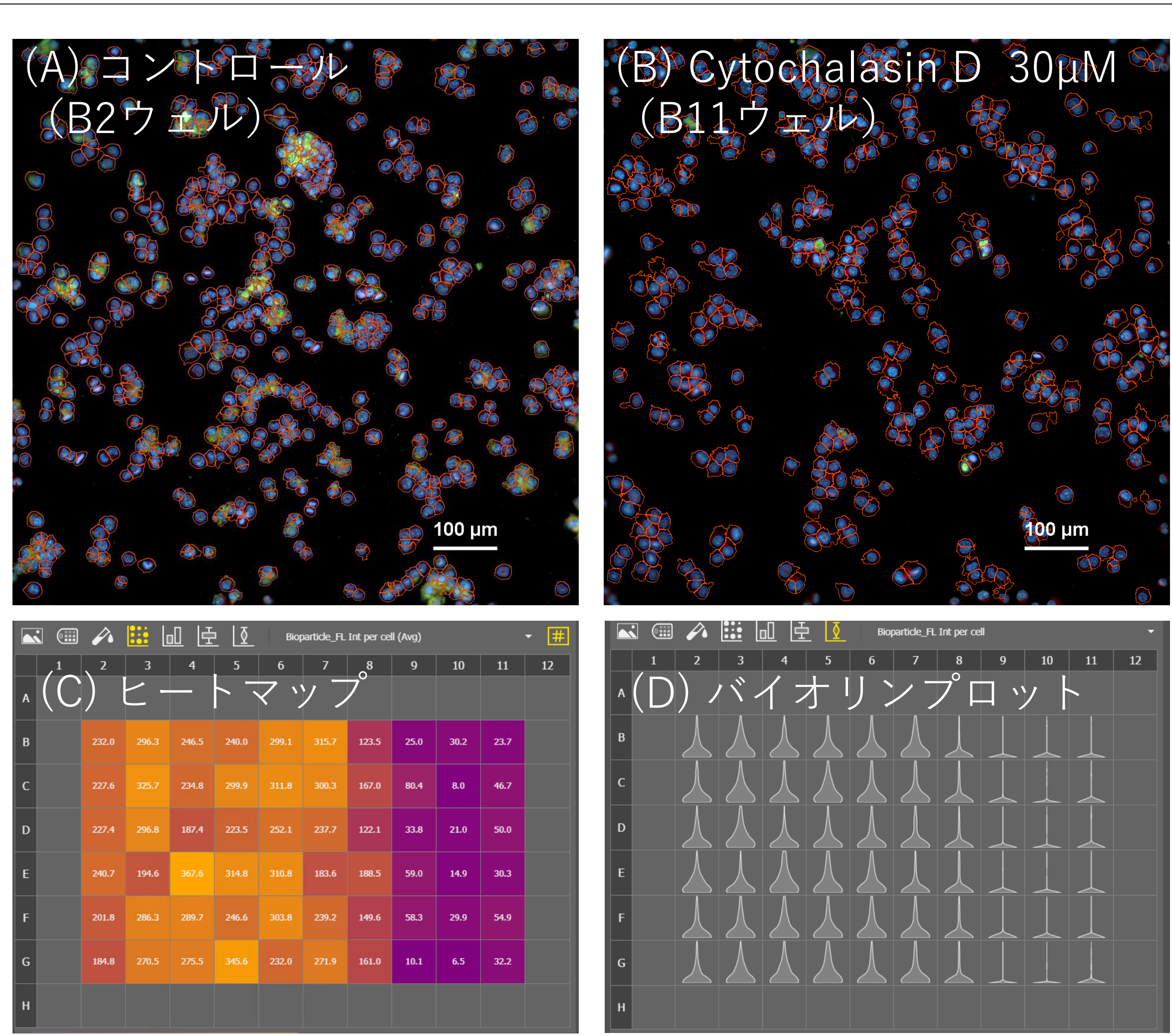


図1. 二値化の方法と *E. coli* BioParticles™ AF488の蛍光強度測定
DAPIで検出した核領域から核マスクを作成。CellMask™ Deep Redで検出した細胞領域から細胞マスクを作成。細胞マスク領域における *E. coli* BioParticles™ AF488由来の蛍光強度を測定した。(A, B) J774.1細胞の蛍光画像にマスクの輪郭をオーバーレイした画像（青：DAPI、緑： *E. coli* BioParticles™ AF488、赤：CellMask™ Deep Red、青色マスク：核、赤色マスク：細胞マスク）、スケールバー：100µm。(C, D) 細胞あたりの *E. coli* BioParticles™ AF488由来の平均蛍光強度の解析結果を各ウェルごとに表示。Cytochalasin Dの濃度は、ウェルプレートマップの左から 0 µM, 0.003 µM, 0.01 µM, 0.03 µM, 0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM。Cytochalasin Dの濃度が3µM以上のウェルでは細胞内に取り込まれた *E. coli* BioParticles™ AF488の蛍光強度がコントロールと比較して低い値を示した。この結果から、Cytochalasin DがJ774.1細胞における蛍光標識大腸菌の細胞内への取り込みを阻害することが示唆された。

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*E. coli* BioParticles™ AF488の平均蛍光強度を測定できました。
- ✓ Cytochalasin DがJ774.1細胞における蛍光標識大腸菌の細胞内への取り込みを阻害することが示唆された。
- ✓ 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	J774.1												
増殖培地	RPMI 1640 + 10% hi-FBS												
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	Cytochalasin D												
試験濃度	Negative control: 0μM Positive control: 10μM To make a dose-response curve, design required concentration points as follows: Ex: (0) 0 μM, (1) 0.003 μM, (2) 0.01 μM, (3) 0.03 μM, (4) 0.1 μM, (5) 0.3 μM, (6) 1 μM, (7) 3 μM, (8) 10 μM, (9) 30 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												

- ✓ ウェルプレートにJiに設置して、Phagocytosis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。

試薬		
製品名	カタログ番号	メーカー名
Cytochalasin D	C8273	Sigma-Aldrich
<i>Escherichia coli</i> (K-12 strain) BioParticles™, Alexa Fluor™ 488 conjugate	E13231	Thermo Fisher Scientific
CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain	C10046	Thermo Fisher Scientific
DAPI Solution (1mg/mL)	19178-91	Nacalai Tesque
RPMI 1640 with L-Gln, liquid	30264-85	Nacalai Tesque
Fetal Bovine Serum (FBS)	172012	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	276855	Sigma-Aldrich
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™
D-PBS (+) Preparation Reagent (Ca, Mg solution) (100x) (100x Ca, Mg solution)	02492-94	Nacalai Tesque

□ 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。

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 Phagocytosis（Option）

- ✓ 画像の取得から解析、グラフ表示まで全自動で実施
- ✓ 蛍光色素で標識した大腸菌（K-12株）由来の細胞領域における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、EC₅₀/IC₅₀の算出結果をPDFで出力できます。

