

# がんスフェロイドの3次元蛍光イメージング および形態・生存率解析のハイスループット化

ライトシートマイクロプレートサイトメータ

C Y T O Q U B E™

これまで創薬を目的とした細胞アッセイは主に2次元培養細胞で行われてきましたが、近年ではより生体に近い環境を再現するために3次元培養細胞（スフェロイドなど）を用いたアッセイが行われています。

しかし、3次元培養細胞の蛍光イメージングや解析は、フォーカス調整や深さ方向など煩雑なスキャン設定を必要とし、厚みのあるスフェロイドから詳細な蛍光像を得るためには多大な画像取得時間が必要です。これらがアッセイのスループット向上の障壁となっています。そのため、3次元培養細胞を用いたアッセイにおける効率的なイメージング技術と解析プロセスの開発は創薬研究にとって不可欠です。

ライトシート技術を用いたCYTOQUBE®は、1軸の走査でウェル全体の3次元蛍光画像を取得し、マイクロプレート全域を1色あたり数分で測定します。これにより、3次元培養細胞を用いたアッセイの効率化が実現し、創薬研究の推進に貢献します。



# キーベネフィット

## ホールウェル3次元蛍光イメージング

ウェル全域の3次元蛍光画像を取得

## 個々のスフェロイド解析

3次元蛍光画像から個々のスフェロイドの形態と蛍光輝度を解析

## 圧倒的なスループット / スキャンと解析の並列処理

プレート全域の3次元蛍光画像を最短21分でスキャン・解析（3波長、サンプル厚200  $\mu\text{m}$  ~ 400  $\mu\text{m}$ ）

# はじめに

創薬研究において、がんスフェロイドの形態と生存率を評価することは、薬剤候補が細胞に与える影響を理解するために重要です。スフェロイドの形態とは、形状、構造、およびサイズを指し、薬剤による変化を示すことができます。スフェロイドの生存率とは、スフェロイド内の生きている細胞の割合を指し、薬剤の細胞毒性効果を反映します。

この実験では、CYTOQUBEを使用してがんスフェロイドのハイスループット3次元蛍光イメージングと解析を行いました。薬剤には、細胞の生存と形態に影響を与える2つの化合物、LY294002 (PI3キナーゼ阻害剤) と Menadione (Cdc25 ホスファターゼ阻害剤) を使用しました。LY294002はPI3K-Akt 経路を阻害することで、細胞の移動と浸潤を抑制し、全体的な細胞生存率を低下させます。Menadioneは細胞内で活性酸素種 (ROS) を生成し、酸化ストレスを誘発することが知られています。この酸化ストレスは細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導するとともにスフェロイドの形態を変化させます。蛍光標識した核 (Hoechst 33342)、生細胞 (Calcein AM)、および死細胞 (Propidium Iodide、PI) から、細胞の生存率と形態を解析しました。

ここでは、3次元蛍光画像をハイスループットで取得可能なCYTOQUBEの技術と、CYTOQUBEで取得したがんスフェロイドの3次元蛍光画像から、がんスフェロイドの形態と生存率を解析した測定事例を紹介します。

# ハイスループットを実現させるスキャン技術

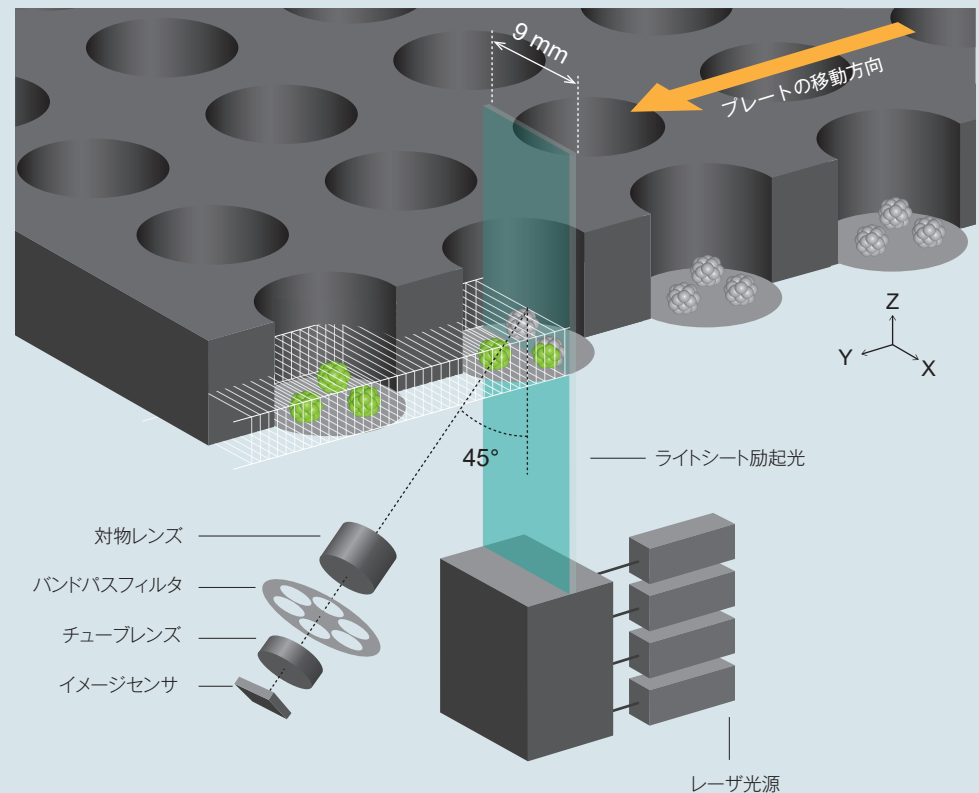
## ライトシート光学系とは

ライトシート蛍光顕微鏡は、特殊な照明光学系と検出光学系の組み合わせにより、多くの利点を有するイメージング技術です。シート状に成形された照明光（ライトシート）を用いて、サンプルの測定したい部分にのみ励起光を照射することが可能です。また、照射位置を変えて複数の2次元画像を取得することにより、3次元蛍光画像の構築を行います。

## CYTOQUBEの光学系

CYTOQUBEは、1536、384、96ウェルマイクロプレート内の3次元培養細胞をハイスループットに測定できるように設計されています。ウェル全域を観察可能なライトシート励起光をウェル底面から垂直に照射し、ウェル底面斜め方向から観察することで、XZ蛍光断層画像を取得します。マイクロプレートを定速移動しながら、連続撮影することで、圧倒的なスループットでホールウェル3次元蛍光画像を取得します。

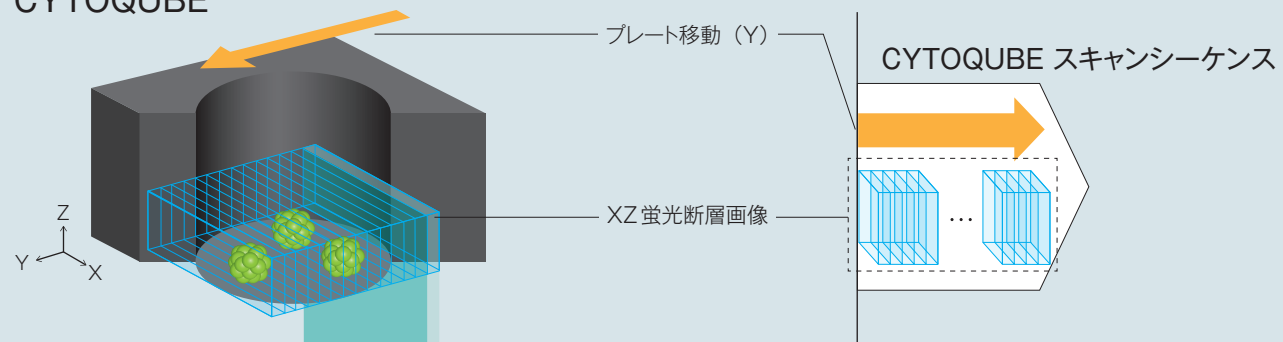
さらに、画像取得と同時に画像解析を行う事で、結果の出力までの時間を短縮しています。



## ホールウエル3次元蛍光イメージング動作の違い

一般的な共焦点顕微鏡では、焦点面をZ方向にずらしてXY蛍光断層画像の取得動作を行うZ-stackにより3次元蛍光画像を取得します。ホールウエル3次元蛍光イメージングを行うには、Z-stack、XY位置の変更、Z-stack、といった動作を繰り返す必要がありました。一方、CYTOQUBEでは、ウェル全域を観察可能な光学系を用いて、マイクロプレートを送速移動させながら画像取得を行います。これによりCYTOQUBEは、一般的な共焦点顕微鏡に比べて、圧倒的なスループットを実現しました。

### CYTOQUBE



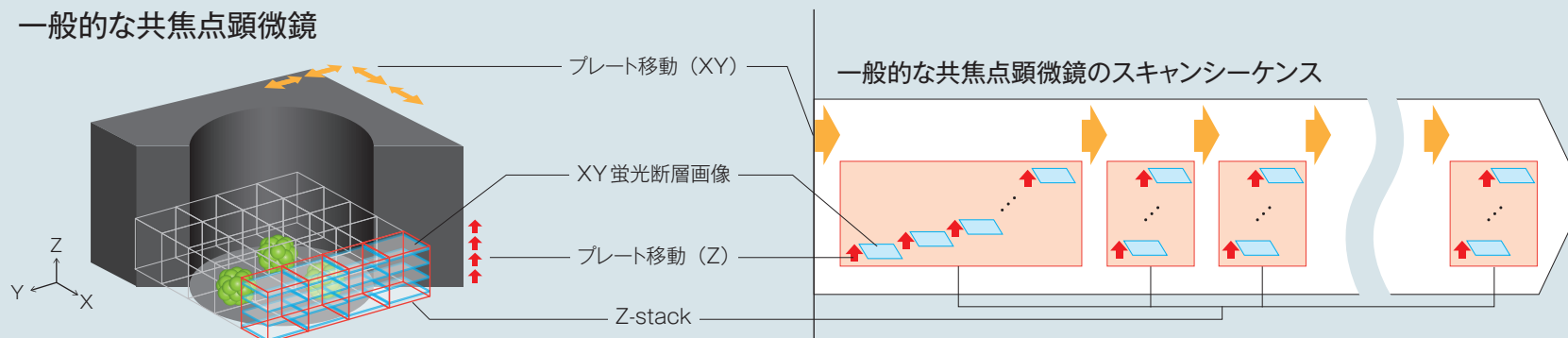
### CYTOQUBE

- ・プレートの移動方向：1軸
- ・移動しながら画像取得
- ・XZ 蛍光断層画像

### 一般的な共焦点顕微鏡

- ・プレートの移動方向：3軸
- ・移動と画像取得の繰り返し
- ・XY 蛍光断層画像

### 一般的な共焦点顕微鏡



# 実験手法

スフェロイド作製用プレートで作製したスフェロイドを40～60スフェロイド/ウェルになるよう2.5 % Matrigelを含む培地で96ウェルマイクロプレートに播種し、薬剤を最終濃度50  $\mu\text{mol/L}$  または100  $\mu\text{mol/L}$  になるよう、スフェロイドに添加しました。

37  $^{\circ}\text{C}$ で培養し、薬剤添加直後および24時間後のマイクロプレートそれぞれに3種類の蛍光色素を添加し、37  $^{\circ}\text{C}$ で45分間染色を行いました。染色後、洗浄操作をせず、CYTOQUBEでスキャン・解析を行いました。

## CYTOQUBE スキャン設定

|                        |               |                                       |
|------------------------|---------------|---------------------------------------|
| Sample depth           |               | 200 $\mu\text{m}$ ~ 400 $\mu\text{m}$ |
| Background subtraction |               | ON                                    |
| Sensitivity            | Hoechst 33342 | 13 ~ 16                               |
|                        | Calcein AM    | 5                                     |
|                        | PI            | 12 ~ 17                               |

96ウェルマイクロプレート10列の3次元蛍光画像スキャン(3波長)と解析に要した時間は約10分でした。

細胞：ヒト神経膠芽腫由来 U-87 MG 細胞スフェロイド\*

薬剤：LY294002 (PI3 キナーゼ阻害剤)

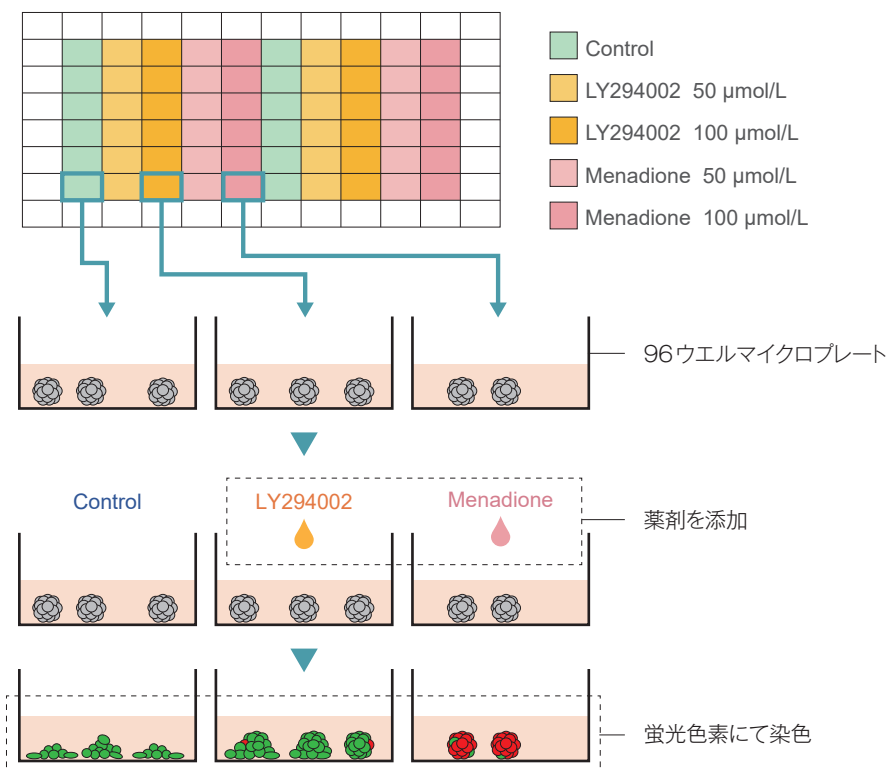
Menadione (Cdc25 ホスファターゼ阻害剤)

蛍光色素：5  $\mu\text{g/mL}$  Hoechst 33342

0.125  $\mu\text{mol/L}$  Calcein AM、

4  $\mu\text{g/mL}$  Propidium Iodide (PI)

## 96ウェルマイクロプレート



# 取得画像

図1は、測定したウェル全域の3次元蛍光画像をマキシマムプロジェクション画像として一覧表示しました。  
この蛍光画像は、マイクロプレートのスキャン中でも、スキャンが終わったウェルから順に確認することが可能です。

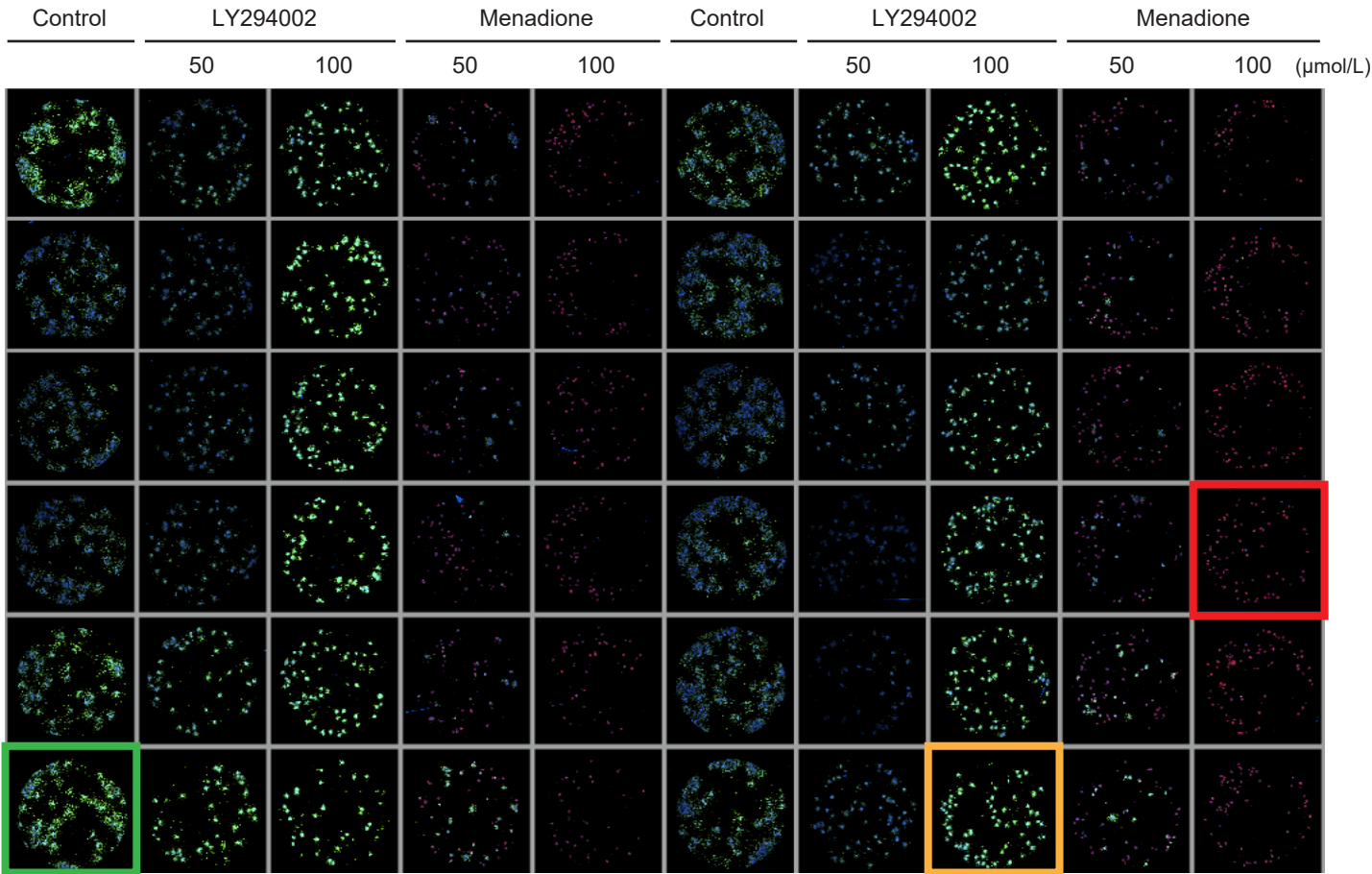


図1：薬剤添加24 時間後の96ウェルマイクロプレートの蛍光画像（3次元画像のマキシマムプロジェクション画像）  
枠で囲ったウェルの3次元蛍光画像やXZ画像は次頁をご参照ください。

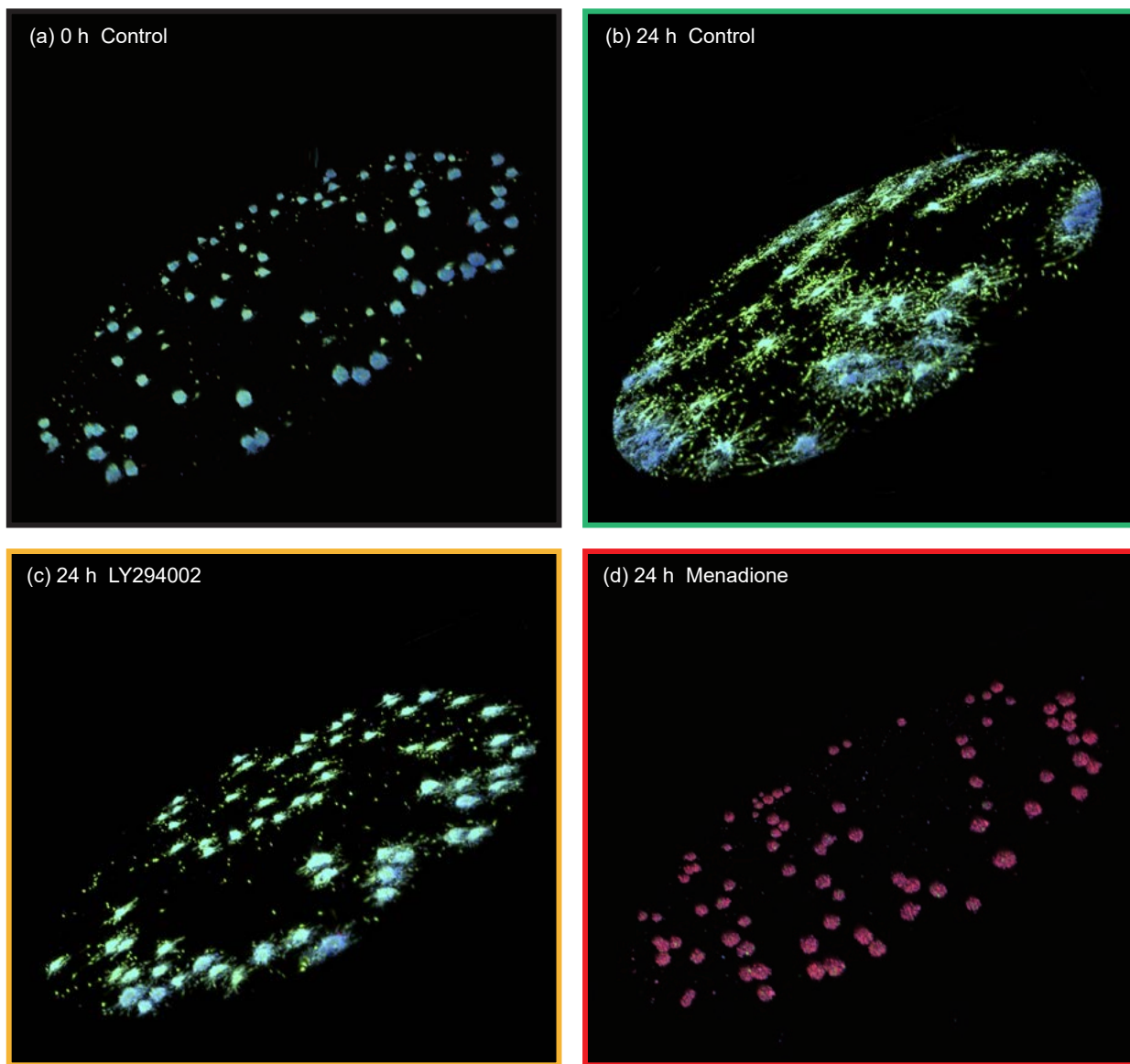


図2：代表的な3次元蛍光画像。実験開始時点（0時間）のコントロール（a）、24時間後のコントロール（b）、100  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 処理24時間後（c）、および100  $\mu\text{mol/L}$  Menadione 処理 24時間後（d）。

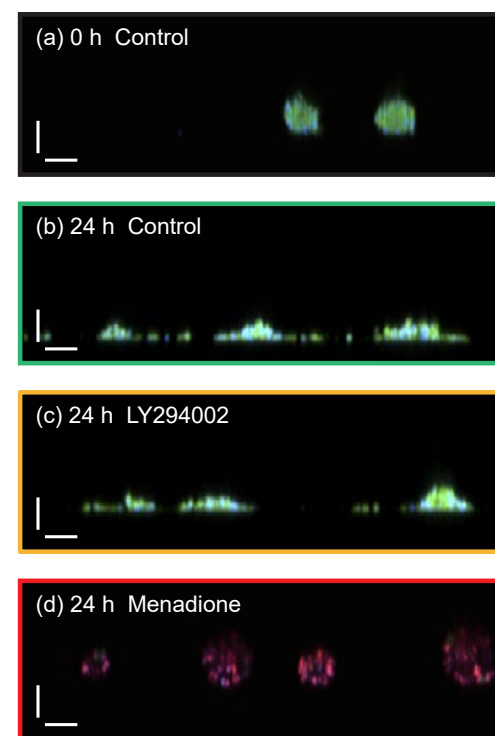


図3：ウェル横断面のXZ画像（Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ）

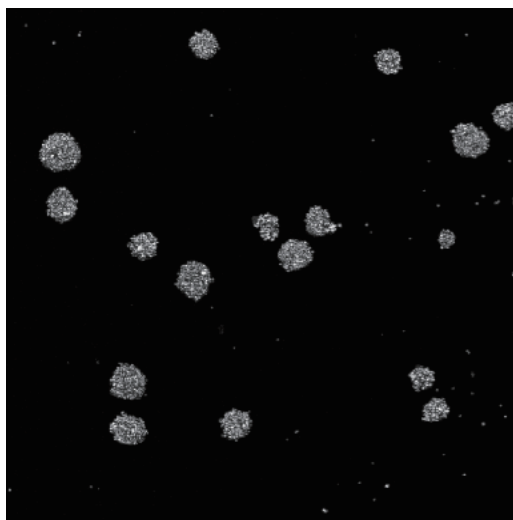
※ 図1、2、3：Hoechst 33342（青）、Calcein AM（緑）、PI（赤）の3波長疑似カラー表示

## スフェロイドの認識

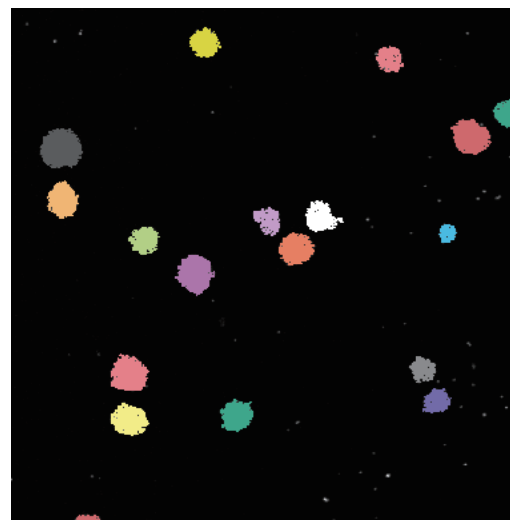
Hoechst 33342の3次元蛍光画像より、個々のスフェロイドのXY平面の最大長（直径）、XZ平面の最大厚さおよび体積を推定しました。さらに、各スフェロイドから得られた蛍光画像に基づき、Calcein AMで染色されたボクセル（生細胞の蛍光の体積）とPIで染色されたボクセル（死細胞の蛍光の体積）の値を定量化しました。これらのデータを用いて、スフェロイド内の生細胞の割合を示す「ライブインデックス」を次の式により計算しました。

$$\text{ライブインデックス} = \frac{[\text{Calcein AMで染色されたボクセルの数}]}{[\text{Calcein AMで染色されたボクセルの数}] + [\text{PIで染色されたボクセルの数}]}$$

蛍光画像（Hoechst 33342）



個々のスフェロイドを認識



Hoechst 33342の3次元蛍光画像において、体積が閾値\*以上の細胞塊を“スフェロイド”として認識しました。

※ 閾値=300 000  $\mu\text{m}^3$

## 個々のスフェロイドの形態および生存率解析

1 ウェル内の個々のスフェロイドのライブインデックスと、直径に対する厚さの比に基づく散布図を図4に示しました。それぞれの点は1つのスフェロイドを表しています。スフェロイドの数は各条件で異なり、実験開始時点（0時間）のコントロール群では58個、24時間後のコントロール群では39個、100  $\mu\text{mol/L}$  LY294002で24時間処理した群では51個、100  $\mu\text{mol/L}$  Menadioneで24時間処理した群では55個でした。

図5では、4枚のプレート（計48ウェル）から得られた結果を示しており、それぞれの点は1ウェルの平均値を表しています。

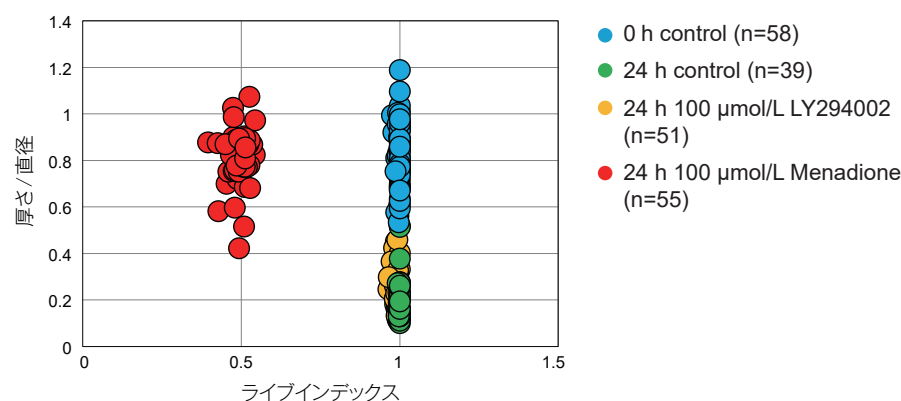


図4：1ウェル内の個々のスフェロイド解析結果

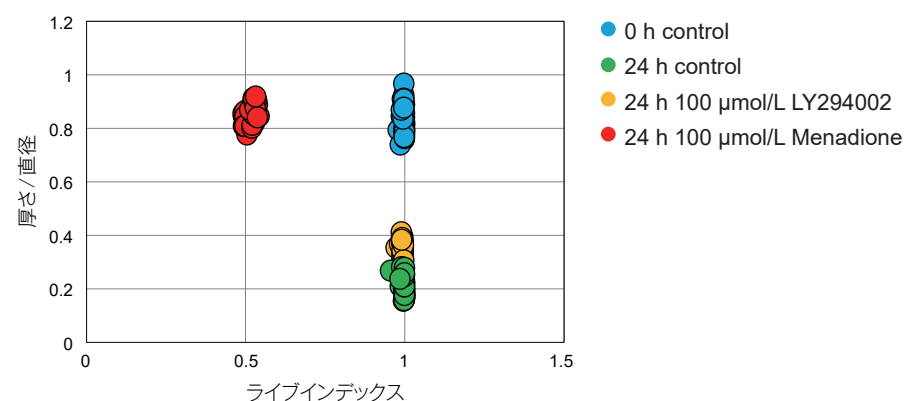


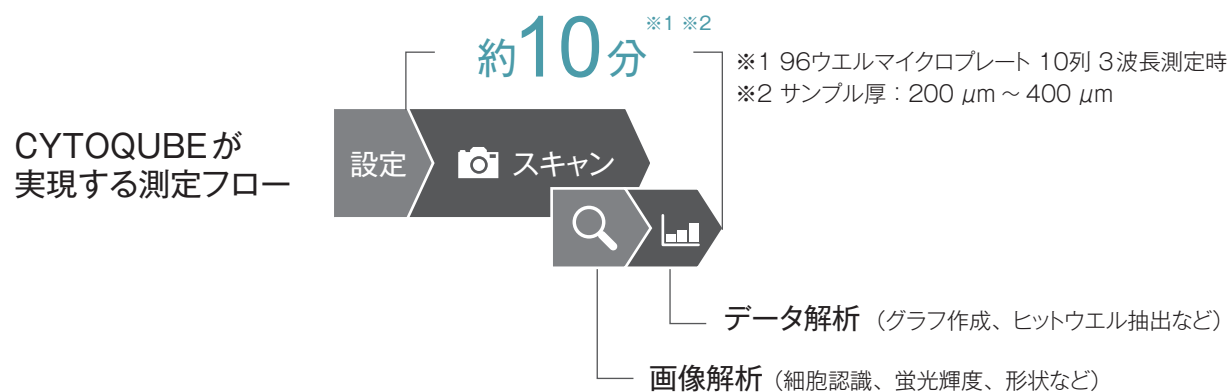
図5：4枚のプレート（48ウェル）における個々のスフェロイド解析結果の平均値

## 結果

実験開始時点（0時間後）でのコントロール群のスフェロイドはほぼ全てが球形ですが、24時間後には厚さの低減が観察されました。また、ほとんどの細胞が生存していることが示されました。100  $\mu\text{mol/L}$  LY294002の添加後24時間後には、スフェロイドの厚さはわずかに低減し、ほとんどの細胞が生存していました。一方、100  $\mu\text{mol/L}$  Menadioneを添加した24時間後には、スフェロイドは、処理前のコントロール群と同様に球形を維持し、ウェル内の細胞の約40 %～60 %が死滅していることが確認されました。これらの結果を得るために要したスキャン・解析時間は合わせて約10分でした。

# まとめ

CYTOQUBEでは、ライトシート技術に応用した独自技術により、1軸の走査でウェル全域の3次元蛍光画像を取得します。この技術を用いることで、ウェル内の様々なサイズや形状を持つすべてのスフェロイドの3次元蛍光画像を高速に取得することが可能です。画像の取得と同時に、個々のスフェロイドの形態情報と蛍光輝度値の定量的な解析結果を表示します。CYTOQUBEを用いることにより、3次元培養細胞を用いたフェノタイプアッセイの効率化を実現し、創薬研究の推進に貢献します。





- CYTOQUBEは、浜松ホトニクス（株）の登録商標です。
- カタログに記載の商品名、ソフトウェア名等は該当商品製造会社の商標または登録商標です。
- カタログに記載の測定例は代表例を示すもので、保証するものではありません。
- カタログの記載内容は2024年9月現在のものです。本内容は改良のため予告なく変更する場合があります。

## 浜松ホトニクス株式会社 [www.hamamatsu.com](http://www.hamamatsu.com)

|                                    |                                              |                    |                    |
|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| <input type="checkbox"/> 仙 台 営 業 所 | 〒980-0021 仙台市青葉区中央 3-2-1（青葉通プラザ 11 階）        | TEL (022) 267-0121 | FAX (022) 267-0135 |
| <input type="checkbox"/> 東 京 営 業 所 | 〒100-0004 東京都千代田区大手町 2-6-4（常盤橋タワー 11 階）      | TEL (03) 6757-4994 | FAX (03) 6757-4997 |
| <input type="checkbox"/> 中 部 営 業 所 | 〒430-8587 浜松市中央区砂山町 325-6（日本生命浜松駅前ビル）        | TEL (053) 459-1112 | FAX (053) 459-1114 |
| <input type="checkbox"/> 大 阪 営 業 所 | 〒541-0052 大阪市中央区安土町 2-3-13（大阪国際ビル 10 階）      | TEL (06) 6271-0441 | FAX (06) 6271-0450 |
| <input type="checkbox"/> 西日本営業所    | 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 1-13-6（いちご博多イーストビル 5 階） | TEL (092) 482-0390 | FAX (092) 482-0550 |

☐ システム営業推進部 〒431-3196 浜松市中央区常光町 812 TEL (053) 431-0150 FAX (053) 433-8031