

1536 ウエルマイクロプレートと生細胞を用いた ハイスループット 3次元蛍光イメージングおよび解析

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™

1536 ウエルマイクロプレートを用いたアッセイは、多数のサンプルを同時に評価することによりスループットの向上やコスト削減が期待されます。しかし、細胞の蛍光イメージングおよび解析に多大な時間と労力を要するなどの理由で、特に生細胞と 1536 ウエルマイクロプレートを用いたアッセイには課題がありました。

CYTOQUBE®では、1536 ウエルマイクロプレートに対して1軸の走査で同時に4列のウエルの3次元蛍光画像を取得するため、1色あたり数分でプレート全体の測定が可能です。さらに、高速性を維持しつつ、共焦点顕微鏡の10倍対物レンズ相当の光学分解能（Z方向）を実現しています。

ここでは、CYTOQUBEを使用して、1536 ウエルマイクロプレートに播種された生細胞の3次元蛍光イメージングおよび解析を、わずか16分で実現した例をご紹介します。



キーベネフィット

1536ウエルマイクロプレートの高速スキャン

同時に4列をスキャン / 384、96ウエルと同じスキャン時間を実現

スキャンと解析の並列処理

共焦点顕微鏡の10倍対物レンズ相当の光学分解能 (Z方向)

ボクセル解像度は、 $2.75 \mu\text{m}$ (X) \times $2.75 \mu\text{m}$ (Y) \times $6.215 \mu\text{m}$ (Z)

はじめに

1536 ウエルマイクロプレートはハイスループットスクリーニングに有用であり、多数のサンプルを同時に処理することで実験の効率と精度を向上させます。さらに、1536 ウエルマイクロプレートを使用することで、より少ない試薬で多くのデータを取得できるため、コスト削減にも寄与します。また、多くのサンプル数により、統計的に有意なデータを得ることが容易になります。

一方、1536 ウエルマイクロプレートを用いた3次元蛍光イメージングと解析には、多大な時間と労力を要します。特に、生細胞を用いたアッセイでは、1プレート全体の蛍光画像取得に時間がかかることでウエル間での時間的差異による測定アーチファクトが生じる可能性があります。これが、1536 ウエルマイクロプレートを用いた細胞アッセイの障壁となっていました。

CYTOQUBE は、1536 ウエルマイクロプレートの3次元蛍光イメージングおよび解析に要する時間を大幅に短縮する技術を搭載し、1色あたり数分でプレート全体を測定します。

ここでは、ハイスループットと3次元蛍光イメージングを同時に実現させる CYTOQUBE のスキャン技術と、1536 ウエルマイクロプレートに播種された生細胞に対し、3波長の3次元蛍光イメージングおよび解析をわずか16分で実施した実験例をご紹介します。

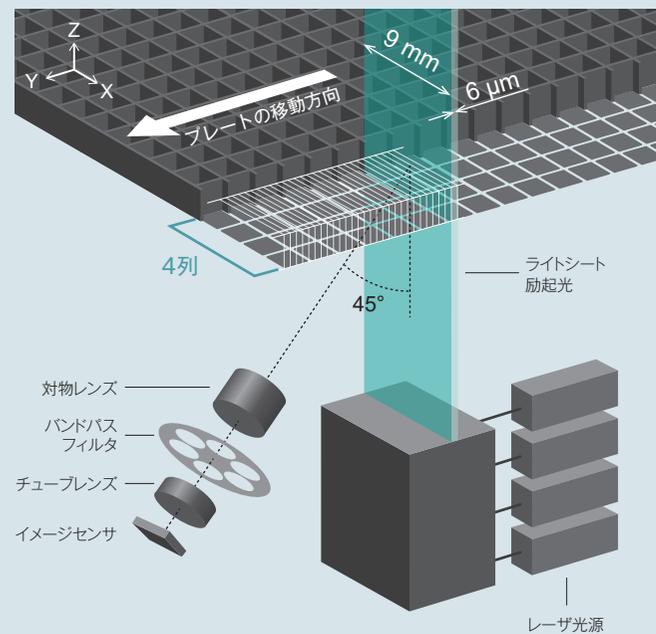
ハイスループットを実現させるスキャン技術

CYTOQUBEの観察範囲

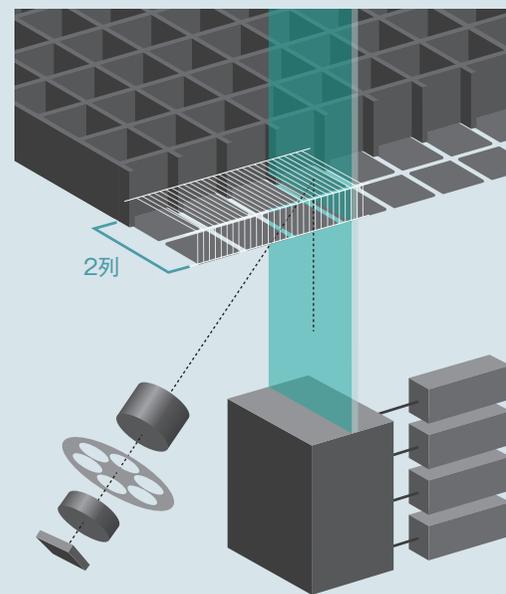
CYTOQUBEはSBS規格サイズのマイクロプレートに対応しており、9 mmの観察範囲（X方向）を確保しています。この観察範囲は、1536ウエルマイクロプレートでは4列分、384ウエルマイクロプレートでは2列分、96ウエルマイクロプレートでは1列分のウエルの領域(X方向)をカバーします。ウエルフォーマットに関わらず、マイクロプレート全体をスキャンする動作は変わりません。

これにより、1536、384、96ウエルマイクロプレートのいずれを使用しても、同じスキャン時間で画像取得が可能です。

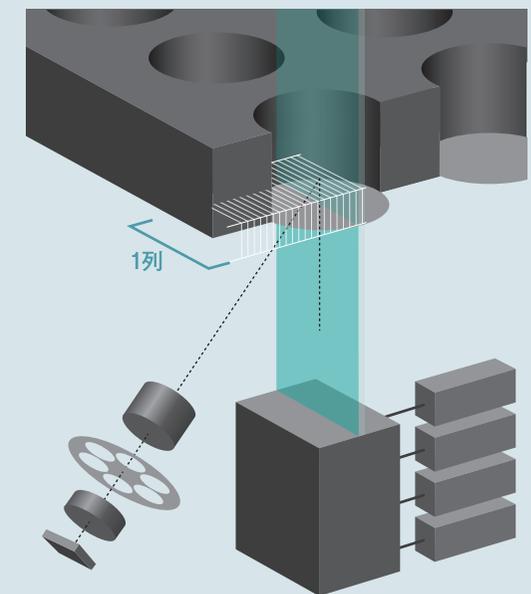
1536ウエルマイクロプレート



384ウエルマイクロプレート



96ウエルマイクロプレート

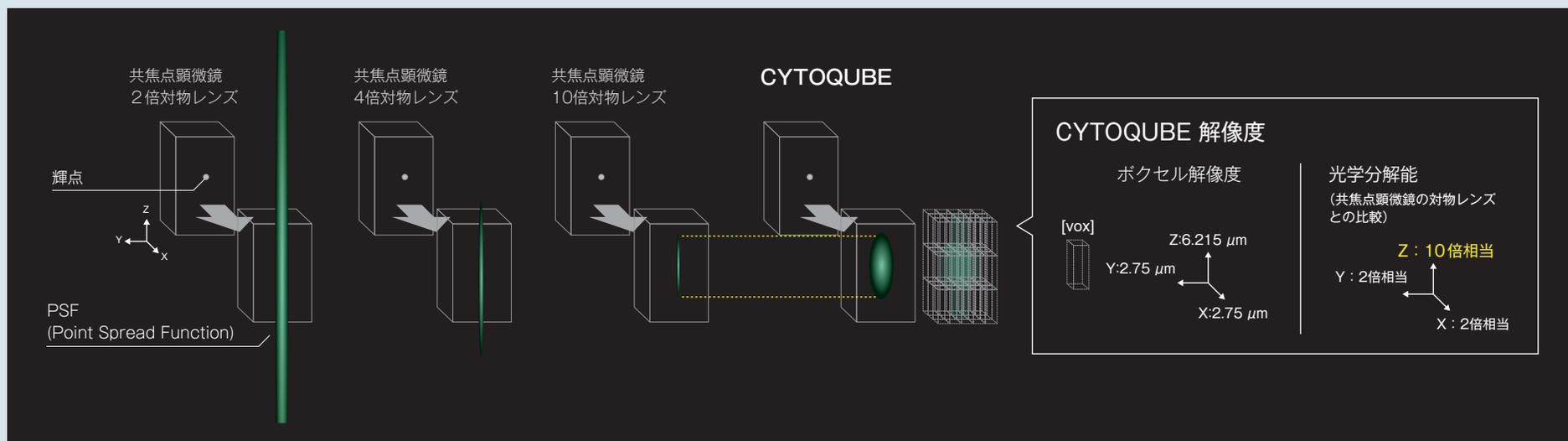


CYTOQUBEの光学分解能と解像度

レンズ等の光学素子を用いる以上、観察対象はボケた状態で画像化されます。一般的に、前述のボケはPSF（Point Spread Function）で表現されます。一般的な共焦点顕微鏡のPSFは、XY方向では細く、Z方向に大きく伸びた形状になります。CYTOQUBEのPSFは、共焦点顕微鏡のPSFと形状が異なり、より球状に近い形をしています。

CYTOQUBEの光学分解能は、PSFの形状から、XY方向は共焦点顕微鏡の2倍対物レンズ相当、Z方向は共焦点顕微鏡の10倍対物レンズ相当を実現しています。CYTOQUBEで取得可能な3次元画像のボクセル解像度*は、 $2.75 \mu\text{m}$ (X) \times $2.75 \mu\text{m}$ (Y) \times $6.215 \mu\text{m}$ (Z) になります。

※ 2次元画像では、画像を構成する最小単位はピクセル[px]ですが、3次元画像では、ボクセル[vox]とし、XYZ方向の成分を持ちます。



実験手法

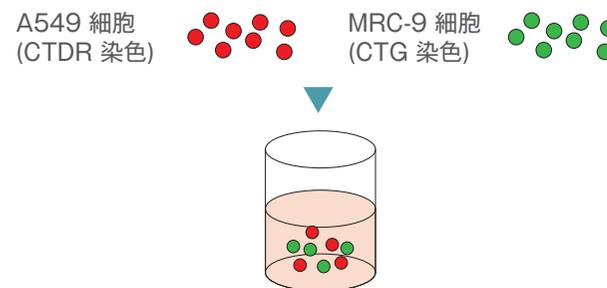
ヒト肺がん由来細胞 A549は 1 $\mu\text{mol/L}$ CellTracker Deep Red (CTDR)、ヒト肺由来繊維芽細胞 MRC-9は 7 $\mu\text{mol/L}$ CellTracker Green CMFDA (CTG) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分間染色を行いました。染色後、PBS で 3 回洗浄し、細胞の播種数及び細胞の混合比を変えて、1536 ウェルマイクロプレートに播種しました。

48 時間後、5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 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。

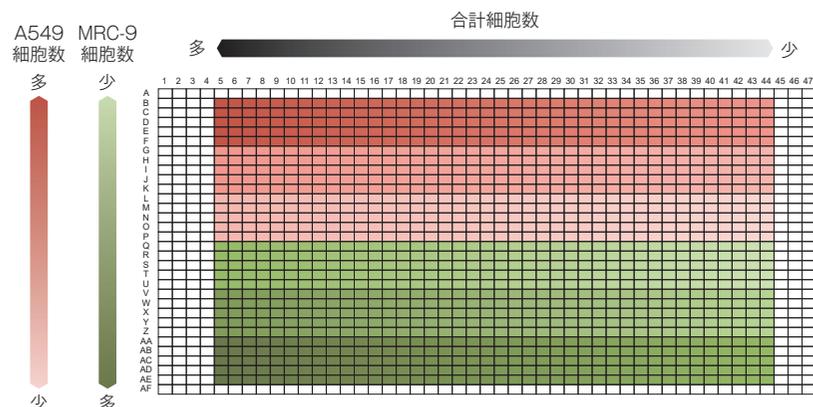
CYTOQUBE スキャン設定

Sample depth	100 μm	
Background subtraction	ON	
Sensitivity	Hoechst 33342	17
	CellTracker Deep Red	15
	CellTracker Green CMFDA	11

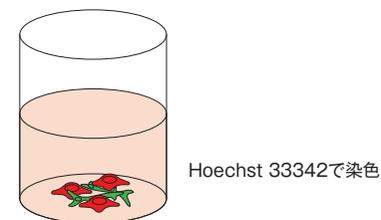
1536 ウェルマイクロプレート 40 列の 3 次元蛍光画像スキャン (3 波長) と解析に要した時間は 16 分でした。



2種類の細胞の播種パターン (1536ウェルマイクロプレート)



48時間



結果

取得画像



図1：1536ウェルマイクロプレートの蛍光画像
3次元画像のマキシムプロジェクション画像 青：Hoechst 33342 (核)、マゼンタ：CTDR (A549)、緑：CTG (MRC-9)

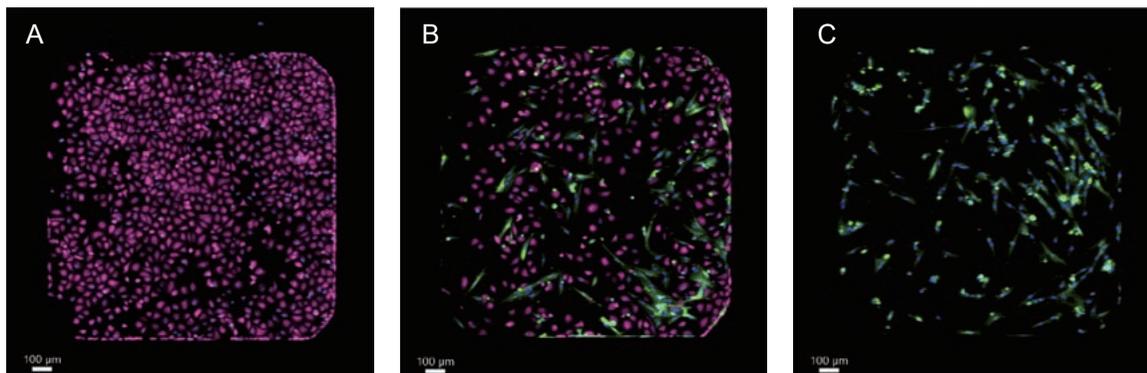


図2：図1のA、B、C各ウエルの3次元蛍光画像から構築したZマキシムプロジェクション画像
 青: Hoechst 33342 (核)、マゼンタ: CTDR (A549)、緑: CTG (MRC-9)

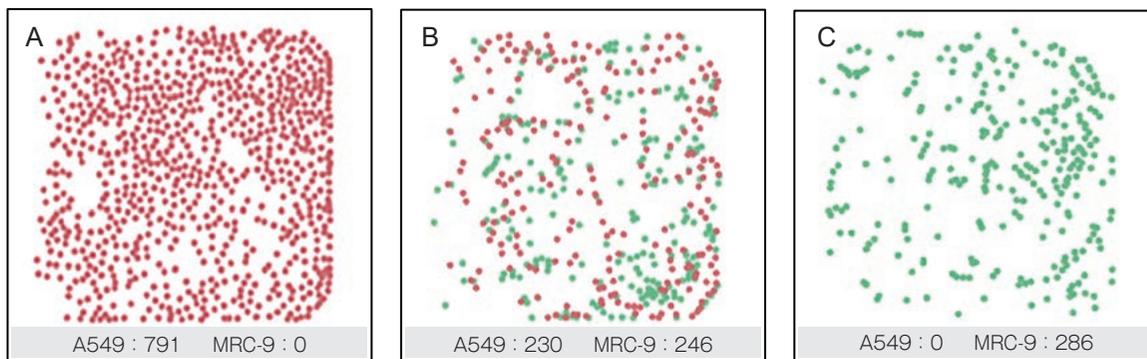


図3：図1のA、B、C各ウエルの各細胞の重心座標プロット図と各細胞数
 赤丸：CTDR (A549)、緑丸：CTG (MRC-9)

図1のA、B、C各ウエルにおいて、1つの細胞の重心座標を示す点のXY位置情報を散布図にプロットするとともに、各ウエルの細胞数を示しました。

播種したA549細胞とMRC-9細胞の混合割合に応じた、CTDR陽性細胞とCTG陽性細胞の数を確認しました。

MRC-9 細胞数 少 多

A549 細胞数 多 少

A549細胞とMRC-9細胞の3次元的な立体構造の違いを確認しました。

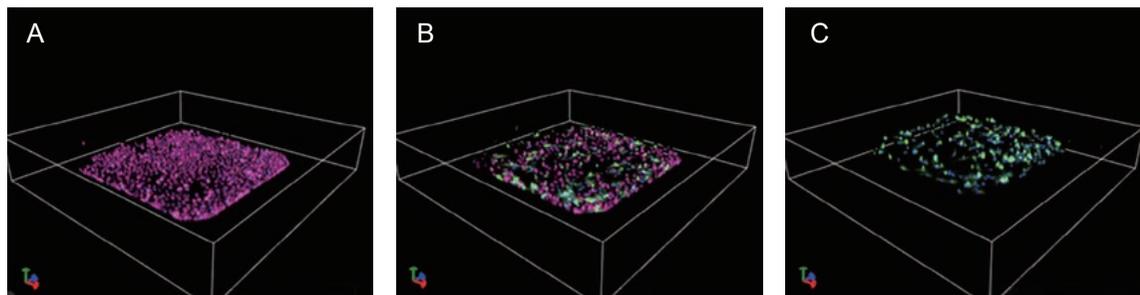


図4：図1のA、B、C各ウエルの3次元蛍光画像
青：Hoechst 33342 (核)、マゼンタ：CTDR (A549)、緑：CTG (MRC-9)

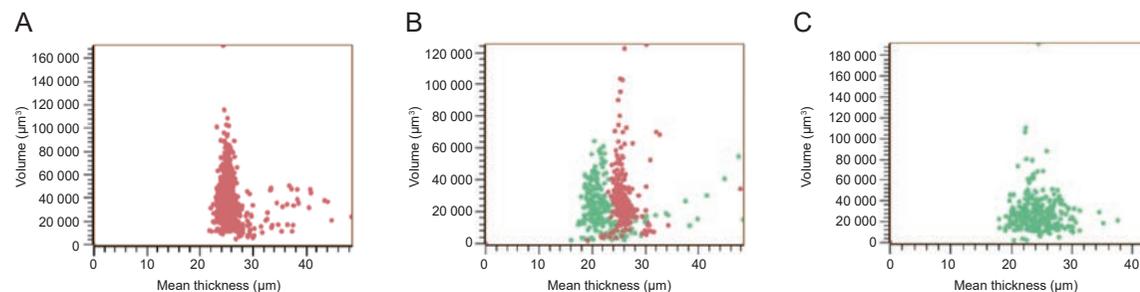


図5：図1のA、B、C各ウエルの解析例

3次元蛍光画像を解析し、横軸に各細胞の厚み、縦軸に体積をプロットした散布図を作成しました。3次元蛍光画像から得られる高さ方向の情報を活かした解析結果が出力されます。

1536ウェルマイクロプレートを用いて、異なる蛍光色素で染色した2種類の細胞の共培養を行い、CYTOQUBEを用いて3次元蛍光画像（3波長）の取得および解析を行いました。各ウエルの蛍光画像から、それぞれの細胞の細胞数、蛍光輝度、厚みや体積の情報を得るとともに、3次元蛍光画像から、細胞の空間的な位置関係を確認することができました。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16分でした。

まとめ

CYTOQUBEは1軸の走査で1536ウェルマイクロプレートの4列を同時にスキャンする高速性と、共焦点顕微鏡の10倍対物レンズ相当の光学分解能（Z方向）を有しています。これにより、1536ウェルマイクロプレートの全ウェルを1色当たり数分の速さで3次元の蛍光イメージング・解析することが可能です。

本実験例では、CYTOQUBEを用いて、1536ウェルマイクロプレートに播種した生細胞サンプルの3次元蛍光画像取得と解析を行いました。1536ウェルマイクロプレートの40列を3波長でスキャンおよび解析し、これらに要した時間は合計で16分でした。CYTOQUBEを用いることにより、1536ウェルマイクロプレートを使用した生細胞アッセイのハイスループット化が期待されます。





- 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

- | | | | |
|---------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| <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