

ZEISS Celldiscoverer 7

新しいイメージングソリューションによる
3次元細胞培養の分析



ZEISS Celldiscoverer 7

新しいイメージングソリューションによる 3次元細胞培養の分析

著者: René Buschow, Thorsten Mielke, Jesse Veenvliet, Marie-Laure Yaspo
Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

Jennifer Bischoff
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany

Volker Doering, Thorsten Kues
Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany

発行日: 2019年11月

はじめに

3次元細胞培養モデルは、この数年でさまざまなライフサイエンス分野において登場し、基本的なツールとして使われるようになりました。その中でも、腫瘍の研究やトランスレーショナルバイオロジー、発生および細胞生物学などの分野で特に広く使われるようになっています。

個々の生物学的イベントのトレース、マーカーに基づくシグナルの定量化、タイムシリーズまたはエンドポイント測定の大規模スループットなどの実験における課題は、多くの場合従来の2Dの培養で解決されてきました。空間次元を導入することにより、多様なサンプルの画像取得と分析がより複雑になり、新しいタスクが発生します。さらに、複雑な3次元構造内における細胞やコンパートメントイベントの特定と定量化は、基礎となる生物学的状態を保つために、ダメージを最小限に抑えて実施する必要があります(文献)。

多くの場合、3次元培養システムには特別なサンプル条件が必要で、厚いウェル底、非平面のU底形状、またはプレートのスカートが非常に高いものなどがよく使われますが、これらは多くの光学装置や自動化されたルーチン作業、分析アルゴリズムにとって困難な条件になります。ここでは、ZEISS Celldiscoverer 7を活用した3次元細胞培養モデル分析の新たなストラテジーを紹介します。特に、取得画像の後処理によってCelldiscoverer 7を実際のハイコンテントイメージングプラットフォームとして使用可能であることに焦点を当てます(文献2)。

このアプリケーションノートでは、ZEISS Celldiscoverer 7イメージングプラットフォームとPerkin Elmer Columbus、arivis Vision4D、およびソフトウェアパッケージZEISS ZEN (blue edition) に統合されたZEN画像解析および後処理機能に基づいて、3つの実験ワークフローを紹介します。これらの関連するソフトウェアパッケージは、自動化された柔軟な方法で定量分析を実行できるため、複雑で多様な学術研究環境に最適なツールです。

例1: 化合物応答

2次元細胞モデルは、化合物に対する細胞応答性、シグナル伝達メカニズム、感度や特異性に関する洞察を得るためのゴールドスタンダードとして長い間使用されてきました(文献3、4)。この例では、384ウェルのマルチウェルプレートを使用して、経時的にラベルフリー3次元細胞培養を分析するアプローチを紹介します。私たちのアプローチにより、70以上の化合物条件とコントロールを4連で特性評価できます。NanoShuttle™(文献5)およびmagnetic 384-well spheroid driveを含むGreiner Bio-One 384-well Bioprinting Kit (GBO #781976)をオルガノイドの調製に使用しました。このシステムの大きな利点は、磁気バイオプリンティングにより、細胞凝集が幾何学的なフォーマットに依存しないことです。このようにして、高感度・高品質のイメージングに最適な物理的特性が得られます。

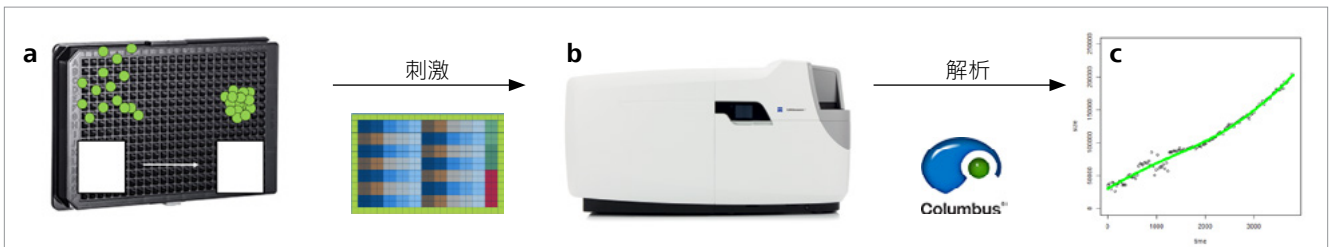


図 1 384 ウェルプレートを使用した 3 次元細胞培養の実験ワークフロー a) 上述のストラテジーの通り、Greiner Bio-one 384-Well Bioprinting Kit を使用。ここでは、250 細胞/ウェルを、Nanoshuttle™ (1 μ l/ 10,000 細胞) とともに、表面が Cell-Repellent (GBO# 781976-SIN) の 384 ウェルマイクロプレートでインキュベートし、bioprinting magnetic drive に配置。スフェロイドは 2 時間以内に形成される。翌日、スフェロイドは与えられた化合物パネルで 4 連で刺激される (a, b) 間) b) ZEISS CellDiscoverer 7 により、安定した環境条件 (温度、CO₂、湿度) で 72 時間以上の自動画像取得が可能。画像データは、Perkin Elmer Columbus ストレージおよび分析環境に自動的に転送される。c) Perkin Elmer Columbus の分析結果 (合計面積 -Y- 経時プロット -X-) は、サードパーティソフトウェア (ImageJ/R) を使用して視覚化される。

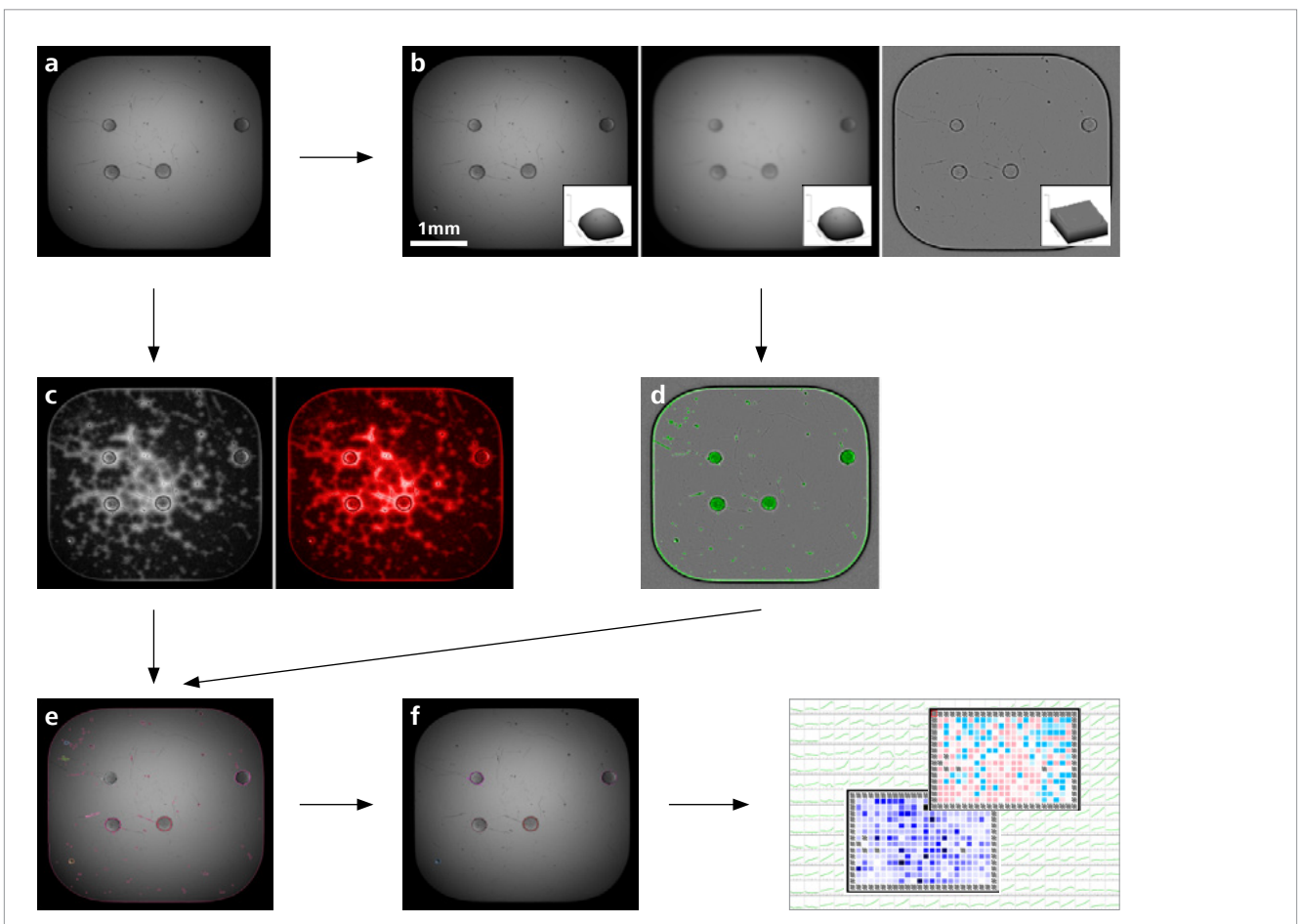


図 2 Perkin Elmer Columbus の分析ストラテジー 図示のルーチンは、40,000 を超える画像に対して段階的に実行される。a) raw 画像をロード。b) カスタム開発された画像アーティファクト (液体メニスカスおよびウェル形状) の補正は、一致する表面プロットを使用した単一ステップによる。c) プライマリーな関心領域の識別 (ウェルの底面全体)。d) 2 次関心領域の識別 (プライマリーオブジェクト内のすべてのオブジェクト)。e) 2 次関心領域およびパラメータ化 (raw 画像の形状、強度、raw 画像 a) のテクスチャ) による raw 画像のオーバーレイ。f) 事前に定義された幾何学的パラメーターに基づいた真陽性オブジェクトのフィルタリング。g) サードパーティのソフトウェア (ImageJ/R) を使用したデータの視覚化と詳細分析。

結果のデータセットを使用して、物質の効率を予測し、基礎研究やトランスレーショナル研究の生物学的機能に関する重要な情報を提供します。

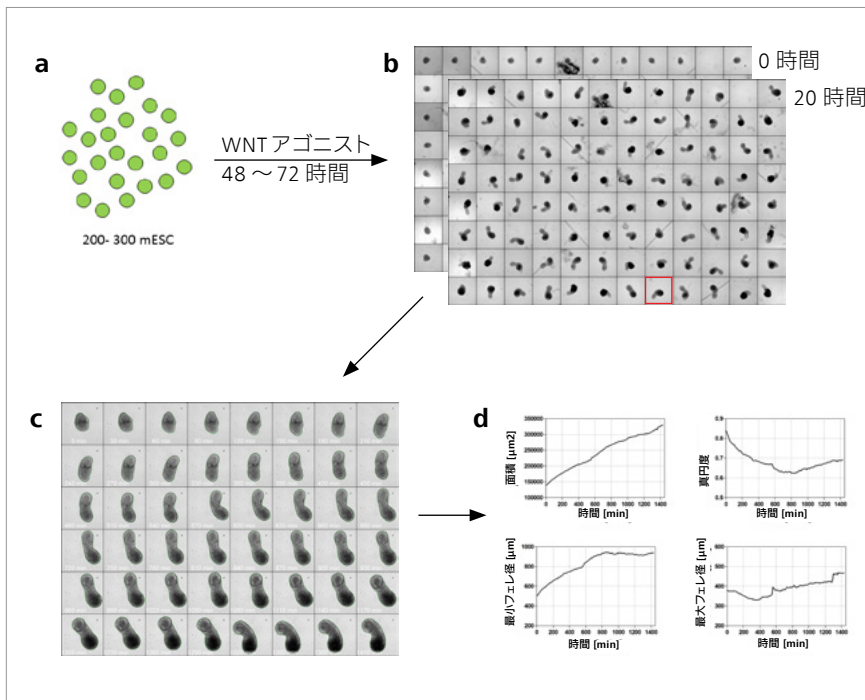


図 3 胚様構造のモニタリング **a)** 200 ~ 300 のマウス胚性幹細胞の細胞懸濁液を 96 ウェル ULA プレートで培養し、WNT アゴニストで刺激。 **b)** 後続の分化誘導プロセスは、ZEISS Celldiscoverer 7 を使用して完全に自動化されてモニタリングされる。 **c)** 取得した画像データは、ZEISS ZEN (blue edition) に統合された画像解析ルーチンに転送される。周囲長、凸状、面積、楕円率などの幾何学的パラメータは自動的に分析される。 **d)** 表現型の比較は、異なる処置により細胞の成長がどう影響を受けるかについての情報を提供する。

例 II: 胚様構造のモニタリング

2 番目の例は、発生生物学でのアプリケーションです。ここでの目標は胚性幹細胞凝集体の自己組織化のモニタリングであったため、Beccari & colleagues が公開しているプロトコルを使用しました (文献 6)。彼らの分化誘導アプローチを ULA 96 ウェルフォーマットで使用し、ZEISS Celldiscoverer 7 を使用した自動画像取得と、統合された、ZEISS ZEN (blue edition) でデータを分析しました。これらの 3 次元構造内で、形態変化を調査しました。

広い視野と作業距離を兼ね備える 0.35 の開口数を持つ 5 倍の対物レンズを使用しました。マルチウェルプレートフォーマットと胚性幹細胞および最新のイメージングのコンビ

ネーションにより、発達する (幹) 細胞システムの自己組織化に関する深い洞察が得られます。さらに、ここで紹介する実際の戦略には、発生生物学および将来のルーチン毒性試験における動物実験を削減、代替、改良する可能性があります。

例 III: 複雑な構造の組成の解明

光学顕微鏡法を使用した 3 次元細胞凝集体の組成の解明には、さまざまな課題があります。第一に、サンプルの光散乱特性に応じて、widefield 顕微鏡での励起光と蛍光の浸透と取得できる深さが制限されます。第二に、3 次元細胞システムまたは条件の不均一の解析は、かなりのスループッ

トを必要とします。さらに、優れた光学セクションを作成する共焦点または多光子のアプローチによるマルチウェルプレートフォーマットでの作業は時間がかかり、多くの場合光毒性があります。ZEISS Celldiscoverer 7 widefield システムは、96 ウェルの個別の Z スタック (~20 スタック) を 4 つのチャンネルで 30 分以内に取得できます。さらに、光学セクションングによる Z スタックの光毒性を克服するために、raw データをデコンボリューションして、コントラスト、S/N 比、および解像度を大幅に向上させることができます。ZEISS ZEN (blue edition) イメージングソフトウェアのデコンボリューションモジュールは、ディープイメージング用の深度毎による PSF バリエーションを含むさまざまなアルゴリズムを提供します。ハイエンドの自動補正対物レンズと組み合わせ、厚いサンプルでも優れた画像品質を実現し、最大限の情報密度を提供します。このような方法でイメージングしたデコンボリューションの高解像度データは、arivis Vision4D を使用したスフェロイドやオルガノイドの細胞組成の評価など、さらなる処理と分析に使用できます。

arivis Vision4D ソフトウェアパッケージを使用すると、ZEISS Celldiscoverer 7 で取得したマルチカラー Z スタックを、合理化されたバッチ可能な方法で変換できます。カスタムされた解析ワークフローでは、「塊検出」機能を使って核を識別し、3 次元オブジェクトのセグメンテーションが可能です。次のステップでは、識別されたオブジェクトを任意のボリュームでフィルタリングして、適切な寸法の核のみを分析します。ここでは、

これらの目的のオブジェクトから、すべてのチャンネル（ここでは赤と緑の特定の細胞マーカー）の蛍光強度を補間しました。細胞集団を特定するために、ユーザーが設定した閾値により、オブジェクトやセルをマーカー陽性または陰性として割り当て、オブジェクトをサブグループに分類することができます（図 4d を比較）。arivis Vision4D と ZEISS Celldiscoverer 7 のコンビネーションにより、3次元細胞システムでの細胞組成の実際の定量化が短時間でできます。

まとめ

ZEISS Celldiscoverer 7 と Perkin Elmer Columbus、arivis Vision4D、ZEISS ZEN (blue edition)、および完全にカスタマイズ可能なワークフローなどのダウンストリームプラットフォームとの相互作用により、合理化された効率的な画像処理と分析が可能になります。高度な実験自動化と組み合わせることで、ZEISS Celldiscoverer 7 は学術研究における真のハイコンテンツイメージングプラットフォームとなります。

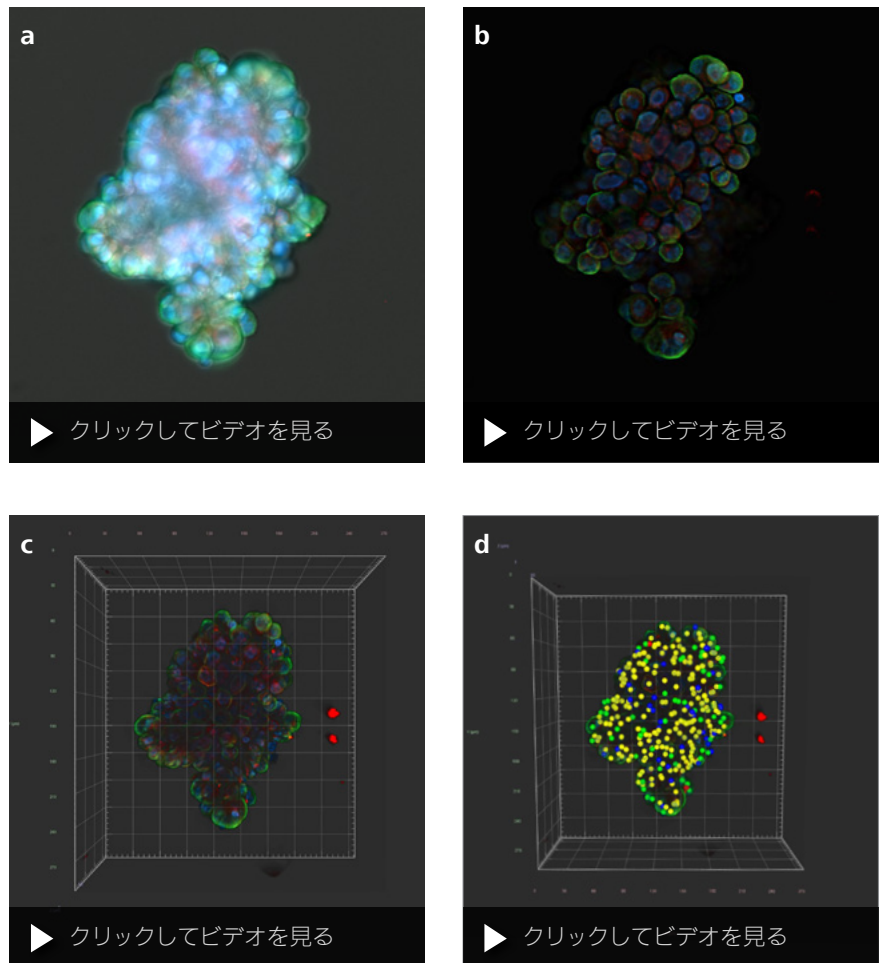


図 4 3Dでの細胞組成の解明 プライマリー腫瘍細胞：96 ウェル ULA プレートで凝集体を形成し、核の対比染色(青)と2つのサブポピュレーション色素(赤と緑)で三重染色され、96 ウェル SCREENSTAR プレート (GBO #655866) でイメージング。 **a)** ZEISS Celldiscoverer 7 で取得した Z スタックの上面図。5 倍 /0.35 対物レンズと 2 倍の変倍装置で 10 倍の総合倍率を使用。 **b)** ZEISS ZEN (blue edition) のデコンボリューションモジュールで制約付き反復アルゴリズムを使用した後の同じデータ。 **c)** プロジェクションで 3D でレンダリングした、結果。 **d)** arivis Vision4D ソフトウェアを使用した画像解析の結果。イエローの円は赤と緑の両方の細胞、緑と赤の細胞は 1 つのサブポピュレーションのみに属し、ブルーはサブポピュレーションに属さない細胞。スケールバーは 100 μm を示す。

文献 (PMID)

- [1] 21042962
- [2] 28520521
- [3] 30002710
- [4] 24831787
- [5] 28524079
- [6] 30283134



Carl Zeiss Microscopy GmbH
07745 Jena, Germany
microscopy@zeiss.com
zeiss.com/celldiscoverer

カールツァイス株式会社
リサーチマイクロコピーソリューションズ
info.microscopy.jp@zeiss.com
<https://www.zeiss.co.jp/microscopy>

地域によって販売されていない製品もあります。製品を医療診断や治療を目的として使用することは、各国の規制により制限される場合があります。
詳細は ZEISS ジャパンにお問い合わせください。
JP_41_013_215 | CZ 12-2019 | JP_200307 | 設計、お届けする製品の内容、技術的な内容は予告なく変更される場合があります。 | © Carl Zeiss Microscopy GmbH