

次世代の細胞解析を可能にする 最新テクノロジー

新しい技術は研究の発展を加速させますが、そのような技術開発には企業の貢献が不可欠です。そこで「製品特集」コーナーでは毎回最新のテクノロジーに注目し、第一線の研究者に技術動向を概説いただき、開発側の各企業には具体的な製品・サービス・アプリケーション例をご紹介いただきます。今回の特集では、次世代化の進むハイスクール・ハイコンテンツな細胞解析機器の新たなトレンドを取り上げます。

<概論>生命現象の新たな一面を定量する細胞解析

古屋智子、池本健三、佐々木功典…………… 1380

<協賛企業記事>

ロシュ・ダイアグノスティックス社…………… 1385

パーキンエルマー社…………… 1388

〈概論〉生命現象の新たな一面を定量する 細胞解析

イメージサイトメトリーの生命科学研究における可能性

古屋智子、池本健三、佐々木功典

現在の生命科学研究では、ハイコンテンツアナリシス、すなわち生体試料からできるだけ詳細な定量的データを大量かつ高速に得ることが求められている。細胞レベルでの定量的なデータを得る方法としてフローサイトメトリーがあるが、近年、細胞や組織の構築を保ったまま多種類のデータを効率的に獲得できる方法としてイメージサイトメトリーが注目されている。またそれに付随するように、多次元データの取得に対応した細胞培養系や、簡便なスクリーニングシステムの開発も進展著しい。そのなかでも本稿では、ますます必要性の高まるイメージサイトメーターについて、その特長を中心に説明する。

はじめに

生命科学におけるめざましい成果は、新しい実験技術や研究機器の開発によるところが大きい。分子生物学にかかわるさまざまな技術により、タンパク質の発現や相互作用に関する研究が分子レベルで解明されてきたが、タンパク質の機能を真に理解するためには、それが生きた細胞において、どのタイミングで（時間）どの場所に存在するか（局在）といった情報が不可欠

である。しかし従来の目視に頼る方法では定量性や再現性に欠け、また大量のサンプルで検証しようとすれば莫大な時間と労力が必要であった。しかし、近年これらの問題を解消できる研究ツールが発表されてきている。

ハイコンテンツアナリシス (HCA)

生命現象を分子レベルではなく、細胞レベル、組織レベルでシステムティックに解析する必要がでてきた

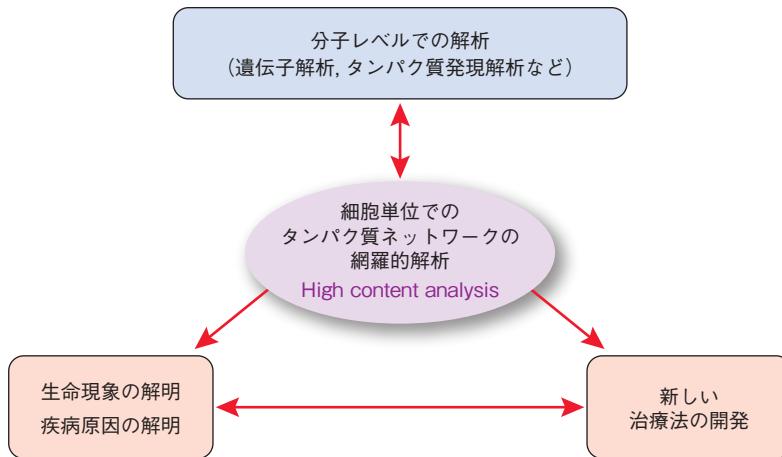


図1 医学生物学研究における細胞レベルでの解析の必要性

医学生物学研究では従来より遺伝子解析やタンパク質発現解析が行われてきたが、真に生命現象を解明するためには、分子レベルで明らかにされてきたシグナル伝達の細胞内ネットワークの細胞レベルでの検証が必要である。細胞レベルでの解析は多種類のタンパク質を多数（多種類）の細胞で観察することが必要とされ、それに応えるのがHCAである。HCAの結果が、生命現象解明への知見を提供し、それが新しい治療へとつながる。さらに新しい治療法を実際の生体に応用する前にもHCAによる有用性や毒性の検証は有力であり、現在、細胞レベルでの網羅的解析は医学生物学研究になくてはならないものである。

現在、生体試料からできるだけ多くのデータを多数サンプルについて高速に獲得するハイコンテンツアナリシス (HCA) 技術が求められている（図1）。HCAを可能にする機器の代表的なものがイメージサイトメーターであり、その原理や魅力について以下に述べてみたい。

サイトメーターとは

タンパク質や核酸といった生体分子を細胞1個単位で計測するのがサイトメーターである。サイトメトリーとは細胞の個数や細胞内物質を、短時間で多数の細胞について計測する方法であり、フローサイトメトリー (FCM) とイメージサイトメトリー (ICM) の2つに大別されている。

サイトメトリーはまずFCMで大きく進歩した。種々の蛍光色素の開発、免疫染色技術やレーザー技術の発展により一度に複数の物質について解析するマルチパラメータ解析が可能になった。またセルソーターでは目的の細胞を分取することも可能である。このように FCMが高機能化していくなか、実用的なICM機器開発はなかなか進まなかった。

レーザースキャニングサイトメーター (LSC) の登場

そのような状況下で、事実上最初のICM機器として1991年にKamentskyらによって発表されたのがレーザースキャニングサイトメーター (LSC) である¹⁾。LSCは現在ICMで主流となっている画像解析による定量とは若干異なり、FCMと同様、細胞からの蛍光をフォトマルチプライヤーで測定し数値化している。LSCによってFCMと同様の測定がスライド上の細胞でも行えるようになったわけだが、LSCでは細胞の位置情報 (XY座標), 真円度, Max Pixel (測定物質の凝集度) といったFCMにはなかったデータも得られるようになった。特にMax Pixel (凝集度) はユニークなパラメータであり、これにより測定対象物質の細胞内の総量は同じでも、それらの分布（広く分布しているのか、どこかに集中して存在しているのか）が異なる細胞を区別できるようになった〔例：DNA量のみでは区別できないG2期とM期の細胞がPI (propidium iodide) 単独染色でもその凝集度の差から区別できる〕。またLSCではサイトグラム上の指定したドットにあたる細胞を呼び出しての形態観察も可能であり、タンパ

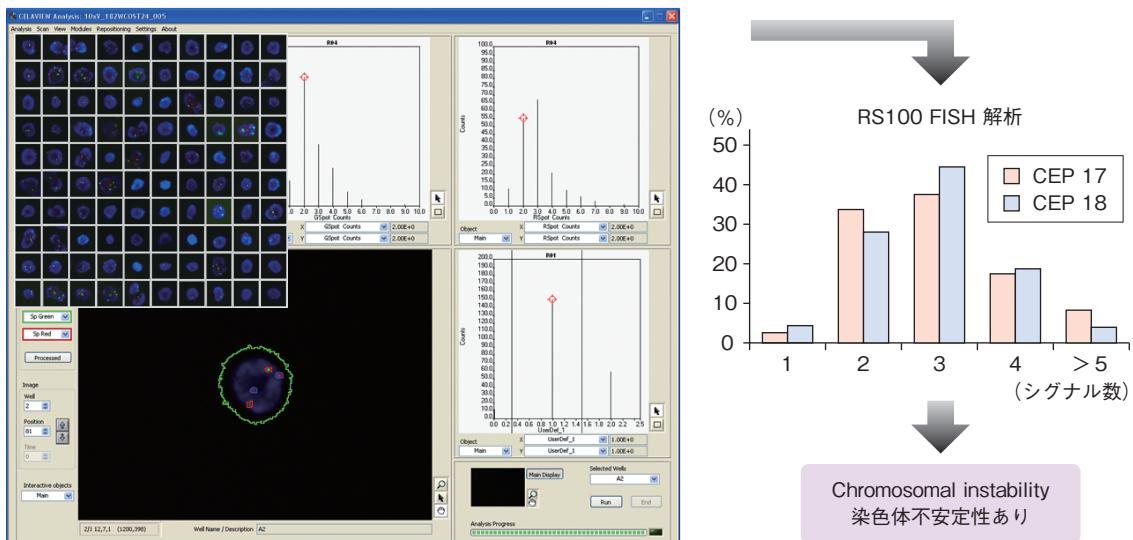


図2 RS100を利用した腫瘍細胞の網羅的FISH解析の例

乳癌組織からタッヂスマア標本を作製し、17番および18番染色体のセントロメアプローブで染色したものをオリンパス社のハイコンテンツ細胞イメージ解析システムであるRS100で解析した。RS100ではまず蛍光像をスキャニングし画像を取得した後、細胞領域およびFISHシグナルを自動的に解析する。ここで示したデータは細胞500個程度を測定したもの。解析結果はエクセルファイルデータとして得られるため、ヒストグラムも容易に作成できる

ク質の局在についても確認できる。初期のLSCでは現在のものと比べて得られるデータはさほど多くなかつたが、それでもFCM機器にはないメリットを十分有するものであった。

イメージサイトメトリーと情報技術の発展

今世紀に入って実用的なICM機器が相次いで発表されるようになったのには、画像取得にかかるテクノロジーの向上とともに、画像解析技術の進歩によるところが大きい。以前からImageJ/NIH Imageに代表される画像解析ソフトは存在しており、これらは細胞一つひとつの画像を解析するのには非常に優れている。しかしICMで必要とされる大量の細胞画像データを一度に処理するには工夫が必要であった（おそらくソフトウェアに詳しくない筆者には無理である）。イメージサイトメーターが実用的なものになるためには、画像からできるだけ多数の特徴を抽出し、そのなかから必要なものを厳選し、分類やクラスタリングする機能を有することに加え、その機能が人間が目視で行うより

も速く優れているといった要件を満たす画像解析ソフトが必要である。またどんなに優れた画像解析ソフトができたとしてもコンピュータの性能が追いついていなければ、実用的な機器にはなりえない。近年、コンピュータの性能が飛躍的に向上したこともあり、ICMに必要な大量の画像情報をパーソナルコンピュータ(PC)で、比較的簡単に解析できるようになり、ICM機器はますます身近なものになってきた(図2)。

イメージサイトメトリーの原理

現在、各社からイメージサイトメーターが発表されているが、その原理は基本的には同じであり、

- ① 画像取得
 - ② 画像解析（各種パラメータの計算など）
 - ③ データ解析
- の3段階からなる。

① 画像取得

ICMでは解析可能な細胞画像を高速に取得することが必要である。画像取得方法はスキャニングや共焦点イメージングなど機種により異なるが、いずれもオー

表 細胞解析技術の比較

顕微鏡	FCM	ICM
再現性 乏しい (同一観測者内でも相違あり)	あり	あり
定性的か定量的か 定性的	定量的	定量的 (形態・位置情報なども数値化)
情報量 (パラメータ数) 限られる	複数 (検出チャネル数と同じ)	多数
処理速度 遅い	高速	顕微鏡よりは速いがFCMには劣る
処理できる検体数 少数	多数	多数

FCM：フローサイトメーター、ICM：イメージサイトメーター

トフォーカス機能を有しており、自動的に良好な画像を高速に取得することができる。機種によっては同時に複数波長のイメージを取得することもできるようになっている。

② 画像解析

ICMでは画像からできるだけ多くの情報を引き出すことに意味がある。画像解析ソフトの機能は各社異なるが、基本的にはまず画像から細胞領域を自動的に認識し、各種パラメータを計算していく。また共焦点イメージングを利用する機種のなかには細胞の三次元構築を可能にしたものもある。

③ データ解析

②で得られたデータについて、FCMと同様のマルチパラメータ解析の他、物質の移動や細胞形態の変化といったFCMでは得られなかった情報についても解析する。

イメージサイトメトリーの特徴

ICMでは時間単位に測定できる細胞数がFCMと比較して少ない。これは測定精度の観点からすると不利な点ではあるが、ICMにはそれを補っても余りあるだけのFCMにはない特長がある。

① 細胞の形態についての情報を数値化したデータが得られる

これはICMの最大の特長である。FCMでは一部の機種をのぞいて、細胞の大きさや、その細胞の蛍光強度の総量を数値として得ることはできるが、測定対象物質が細胞内のどの場所にあるのか（細胞質なのか、核内なのか）、分布はどうなのか（細胞質全体に分布し

ているのか、ある狭い領域に凝集して存在しているのか）、質感（英語ではTexture）はどうか、また同時に複数物質を解析する場合にはそれらの相互関係はどうなっているか、という情報については全く得ることができない。しかし、ICMではこれらの情報を画像解析技術により数値化したデータとして取得することができる（[パーキンエルマー社協賛記事](#)参照）。

② 測定後にも細胞を観察することができる

FCMではセルソーターで分取された細胞以外は測定後に観察することはできない。しかし、ICMは取得した画像をもとに種々のパラメータを解析ソフトで算出するため、測定後でもある特徴を有する細胞集団について、その形態を画像で観察することができる。したがってサイトグラム上のドットがゴミなのか、細胞なのかが簡単に確認できる。さらに実験をしているとサイトグラム上の予想外の場所に細胞集団が現れることがあるが、FCMではもう一度同じ条件のサンプルを準備し、セルソーターで分取しなければそれらの細胞の形態を確認することができない。しかしICMではあらたにサンプル調整をすることなく、取得済の画像を見直すことでこれらの細胞の形態観察がすぐにに行える。

③ 細胞および組織を自然な形のまま測定できる

FCMでは接着性の培養細胞や組織検体からサンプルを調製する場合、トリプシン処理などで細胞を一つひとつばらばらにして細胞浮遊液としなければならない。一方、ICMでは細胞や組織を自然な形のまま測定可能なため、単細胞化する手間が省け、より自然に近い状態の細胞を解析することができる。

④ 荧光色素以外でも測定可能である

蛍光染色した細胞、組織の画像をもとに解析するのがICMの主流であるが、機種によっては化学発色に対応しているものもある。多数の組織検体を対象とした解析などには有用である。最近では標識物を使わずに電気的インピーダンスの変化によって接着性や形態変化といったパラメータを取得できる機器も開発されており、今後さらなるアプリケーションの拡張に期待が高まっている（[ロシュ・ダイアグノスティックス社協賛記事](#)参照）。

⑤ 経時的变化を追うことができる

ICMではいわゆる“ライブイメージング”技術との組合せにより、細胞を培養しながら測定することができる。薬剤添加などの刺激に対するタンパク質や核酸の量的変化はもちろんのこと、神経突起の伸長といった形態変化、マトリゲルを利用した細胞の浸潤能や運動能についても定量的データとして入手することができる。

⑥ ハイコンテンツアナリシスに対応

現在の生命科学研究ではより多くの材料からより多くのデータを取得するハイコンテンツアナリシスが求められている。特に新薬の効果判定、毒性評価は多種類の細胞での評価が必須となっている。多くのICM機器はマイクロウェルプレートに対応し、測定も自動化、高速化されており、細胞ベースのハイスループットスクリーニングを中心に、このニーズにも対応している。

ICMでは取得した大量の画像データは時にその管理が問題となるが、現在では画像の保存・共有・管理を行うための便利なシステムも開発されており、研究の効率化に有効である（[パーキンエルマー社協賛記事](#)参照）。

なお、表に顕微鏡観察、FCM、ICMの違いを一覧にまとめた。

おわりに

細胞は生命の基本単位であり、細胞観察、計測は生命科学の基本である。フローサイトメーターの開発により細胞計測の自動化、高速化が進んだ。また三次元環境での細胞培養を可能にするツールや、さまざまな遺伝子操作、そして最近ではiPS細胞の作製までもが

身近なものとなり、多種多様な細胞レベルでの実験技術が多くの研究者の力となっている。しかし、肝心の細胞形態については長い間人の目による観察に頼ってきた。細胞内、組織内には複雑なタンパク質分子の機能的ネットワークが張り巡らされており、生命現象を理解するためにはこのネットワークの形態情報まで含めた解明が必要であり、その手助けとなる新しい細胞解析技術のさらなる発達を今後も期待したい。

文献

- 1) Kamentsky, L. A. & Kamentsky, L. D. : Cytometry, 12 : 381-387, 1991

Profile

古屋智子

山口大学大学院医学系研究科先端分子応用医科学講座
分子病理学部門（第二病理）助教。
2000年、山口大学医学部卒業、「04年、同大学院医学
研究科修了（医学博士）。「06年より現職（当時は助手）。
サイトメトリーと癌の分子遺伝学的研究に携わっている。
学部学生時代に出会ったLSCとはすでに10年以上のお
付き合い。現在もLSCを使用して、腫瘍細胞におけるタ
ンパク質の網羅的解析を地味に続けている。

池本健三

山口大学大学院医学系研究科先端分子応用医科学講座
分子病理学部門（第二病理）、技術専門職員。
細胞検査士、国際細胞検査士。

佐々木功典

山口大学大学院医学系研究科先端分子応用医科学講座
分子病理学部門（第二病理）教授。
1973年、山口大学医学部卒業、「77年、同大学院医学
研究科終了（医学博士）。「80年、済生会下関総合病院病
理科医長、「91年、岩手医科大学第一病理教授、「96年
より現職。教室の主な研究テーマは癌の分子遺伝学的解
析。サイトメトリー技術を利用したハイスループット解
析技術の開発にも力を入れている。

細胞解析にもラベルフリー& リアルタイムモニタリングの世界を！ 細胞解析の新規スタンダードへ

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 AS事業部 サイトミクスチーム
平沼秀記

近年、細胞の機能解析はその重要性をますます増している。本稿ではロシュ・ダイアグノスティックス(株)の細胞解析の新技術として、ラベルフリーかつリアルタイムに細胞イベントを観察可能なxCELLigence(エクセリジェンス)システムと、抜群の明視野イメージ取得が可能かつ蛍光イメージも同時取得可能なマイクロタイヤープレート用イメージベースセルアナライザCellavista(セラビスタ)を紹介する。

xCELLigenceシステム

xCELLigenceシステムは、専用のE-Plateとよばれるマイクロプレート(底面に微細金電極を配置)を用いて培養細胞の増殖や形態変化によって生じるインピーダンス(電気抵抗値)の変化をリアルタイムに測定するシステムである。インピーダンス測定は細胞数、バイアビリティ、形態といった細胞の生物学的状態の定量的情報を提供する。本システムはハイスループッ

トスクリーニングのみならずさまざまな細胞ベースアッセイにそのパフォーマンスを発揮する。本システムには1枚の96ウェルE-Plate 96を使用するRTCA SP、ハイスループットにも対応可能な6プレートタイプのRTCA MP、16ウェルのE-Plate 16と浸潤／移動の測定が可能なCIM-Plate 16を使用することができるRTCA DPの3タイプが用意されている(図1)。

次にxCELLigenceシステムの主なアプリケーション

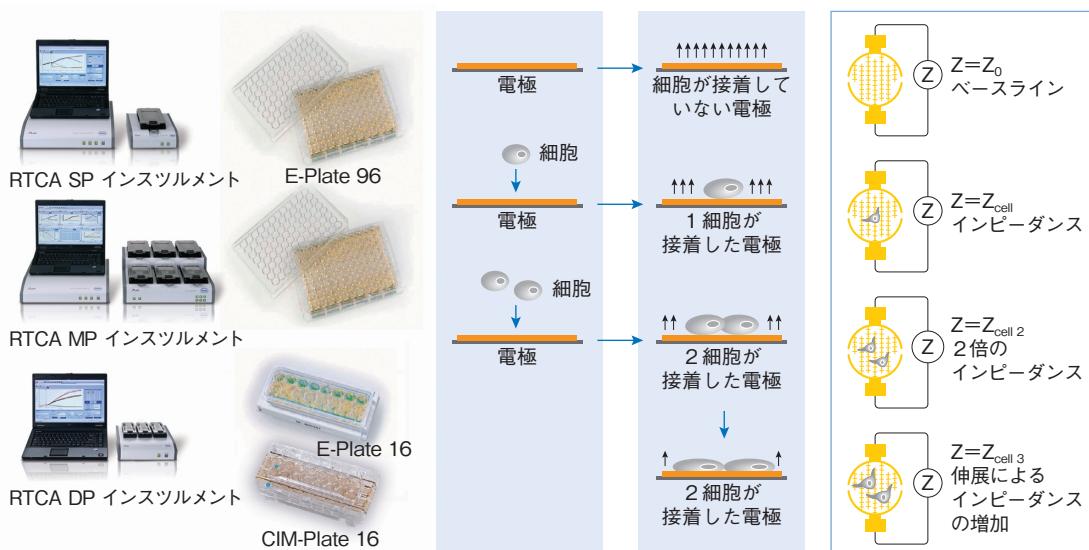


図1 xCELLigenceシステム RTCAインストルメントと原理

xCELLigenceシステムは接着細胞の増殖、形態の変化をリアルタイムにインピーダンス(電気抵抗値)の変化で検出する

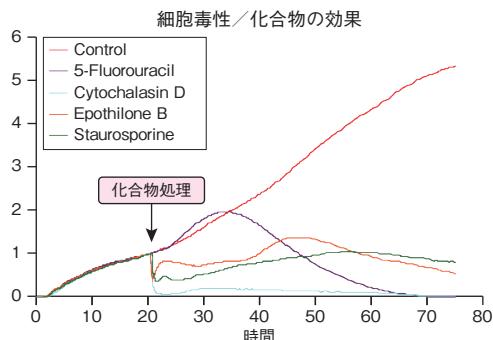


図2 RTCA SP インスツルメントを使用した化合物によるHeLa細胞への細胞毒性評価

化合物の作用機序は以下の通り。5-Fluorouracil: DNA損傷, Cytochalasin D: アクチン重合阻害, Epothilone B: 有糸分裂阻害, Staurosporine: 非選択的カイネティック阻害

の1つであるさまざまな化合物における細胞毒性のリアルタイムモニタリングのデータを紹介する。HeLa細胞を2,000細胞／ウェルで播種し、細胞を15分ごとに20時間測定した後、さまざまな作用機序を有する化合物で処理しインピーダンス変化を75時間まで測定した。その結果、それぞれの化合物でその作用機序に依存した特徴的なカイネティックパターンが得られた(図2)。このカイネティックプロファイルは、作用機序が未知

の化合物の作用機序を推測する手掛かりとなる。

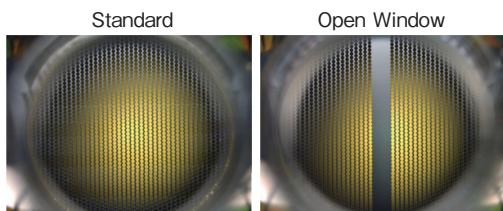
Open Window E-Plate 96

通常のE-Plate 96は、電極が底面の80%を覆っており顕微鏡による観察が困難であるため、一部の研究者からE-Plate 96の改良が望まれていた。そこでこのほどE-Plate 96の底面の中央に幅500μmの窓(電極非配置)を開けることにより顕微鏡観察やイメージデータ取得に対応可能なOpen Window E-Plate 96の新発売が予定されることとなった。図3にxCELLigenceシステムとOpen Window E-Plate 96を用いて細胞増殖とパクリタキセルによる細胞死をモニタリングした結果を示す。

xCELLigence RTCA DP用 CIM-Plate 16

—細胞の浸潤と移動をリアルタイムに測定—

CIM-Plate 16 (Cell Invasion/Migration-Plate 16)は、細胞の浸潤／移動をリアルタイムかつオンラインで測定する初めてのデバイスである。CIM-Plate 16はE-Plateと同様に細胞培養用のプレートに配された特殊な微細電極でインピーダンス変化を測定することで、細胞の浸潤／移動の測定を可能としている。細胞への



A

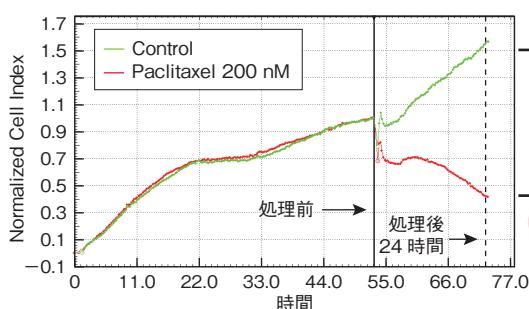
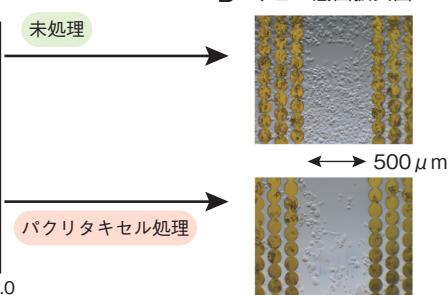


図3 Open Window E-Plate 96 を用いた細胞毒性アッセイ

細胞増殖と細胞死を、xCELLigenceシステムによって連続的にモニターした(A)。イメージはパクリタキセル処理の24時間後に得られた(B)。パクリタキセル処理によるプレート内の細胞の状態が視覚的にも確認できている

B ウェル底面拡大図



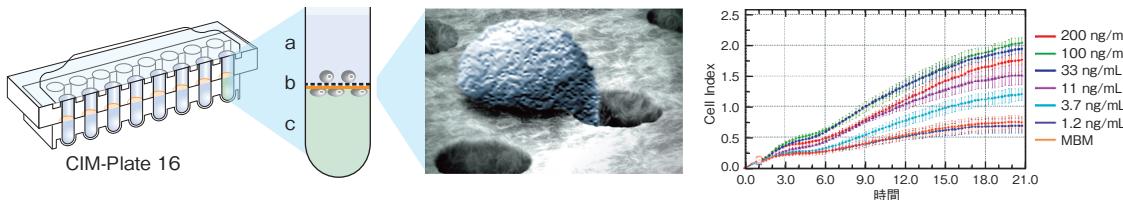


図4 CIM-Plate 16におけるHGFによるHUVEC細胞の移動

HUVEC細胞を添加後、20時間の移動をモニタリング。ローアーチャンバー中のHGF濃度に依存した移動がみられる。アッパークリアチャンバーのメンブレンと電極面(b)にフィブロネクチンをコートしている。MBM:migration basal medium

標識や染色のための固定は必要ない。CIM-Plate 16はプレートカバー(リッド)、アッパークリアチャンバー、ローアーチャンバーで構成されており、アッパークリアチャンバーは16ウェルの底面にポアサイズ8μmのポリエチレンテレフタレートのメンブレンがシールされており、そのメンブレンの裏面に微細金電極を配している。ローアーチャンバーも16ウェルが独立しており、培地や細胞に対する化学誘引物質が添加できるようになっている。図4にCIM-Plate 16および代表的な取得データを示す。

その他のxCELLigenceシステムのアプリケーション

- 細胞増殖と細胞の品質コントロール
- 受容体(GPCRs、受容体型チロシンキナーゼ)機能解析
- 細胞の付着と接着
- ウイルス介在性細胞変性(CPE)

Cellavista

Cellavistaはセルライン開発、細胞機能研究、創薬での細胞解析などの幅広いアプリケーションのための、明視野と蛍光の利点を組合せた高速で、フレキシブルなイメージベースのプラットフォームである(図5)。

6ウェルから384ウェルのさまざまなマイクロプレートに対応しており、T-フラスコやスライドガラスでの測定も可能である。Cellavista high-endでは明視野と最大6種の蛍光測定が可能で、×2～×40までの倍率に対応し、イメージ取得、解析、データ評価までを自動で行える。

Cellavistaのアプリケーション

- シングルセルクローニング
- 細胞数、細胞密度測定
- 浮遊細胞カウント
- 細胞核カウントと特徴付け
- トランスフェクション効率
- プレート品質コントロール
- ウイルスブラークアッセイ
- 蛍光タンパク質発現レベル
- アボトーシスアッセイ
- 創傷治癒アッセイ
- セルクラスター(ES細胞の分化測定)

おわりに

ロシュ・ダイアグノスティックス(株)では、今後も細胞解析分野へ「ラベルフリー」、「リアルタイム」をモットーに、より自然に近い状態で明瞭に細胞イベントの観察が行えるシステムを開発・提供していく予定である。

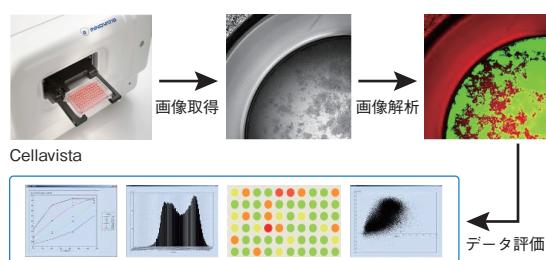


図5 Cellavista測定ワークフロー



ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部(研究用試薬・機器)

〒105-0014 東京都港区芝2-6-1
TEL: 03-5443-5287 FAX: 03-5443-7098
WEB: <http://www.roche-biochem.jp>

次世代細胞解析に不可欠な ハイコンテンツイメージ解析テクノロジー とデータマネジメント

株式会社パーキンエルマージャパン

バイオディスカバリー事業部

塩田 良

顕微鏡のオートメーション化や、いわゆるハイコンテンツアナリシスとよばれるマイクロプレートを利用したイメージング技術が脚光を浴びている。さまざまな条件下での細胞の応答を、網羅的に観察することを可能にしたこれらの技術を活かすためには、装置が生み出す大量のイメージデータをいかに効率よく選別するかも重要な鍵となる。本稿では、次世代の細胞イメージングを成功に導くのに不可欠な画像解析の新しい手法とイメージデータの管理について紹介する。

最先端のイメージングが直面する問題

プロジェクト開始から13年かけて解読されたヒトゲノムの配列データは、約780 MB、CD-ROMたった1枚に収まる程度の情報量しかなかった。1976年創刊のCell誌のデータ量も概算で、すべてあわせても20 GBに満たないと見積もらっている。世界の英知を集めていると考えられる米国国会図書館でさえ、文字データとして換算すると15 TBにしかすぎない。1 TBのハードドライブが近所の電気屋で1万円以下で購入できることを考えると、これまで私たちが蓄積したデータは、意外なほど少なくみえる。

一方、現代の細胞生物学が生み出している細胞や組織、生体のイメージは、これまでの生物学で扱ってきたデータ量の常識を覆そうとしている。最先端のイメージングシステム、例えば自動化された顕微鏡や、いわゆるハイコンテンツイメージングとよばれるマイクロプレートを利用したシステム（図1）を用いれば、たった1日で数100 GBのデータが生み出されるようになった。

次世代の細胞生物学では、このように日々生み出される膨大なデータから有意な差を見つけるテクノロジーが不可欠になるだろう。鍵となるテクノロジーは2つ。



図1 ハイコンテンツイメージングシステム Opera™ と Operetta™

A) Opera™の外観。Opera™は、1日で30万枚以上の共焦点イメージを撮影できるハイコンテンツイメージ。タンパク質の局在変化や毒性試験、ライブセルを用いた細胞小器官ベースのスクリーニング、3次元解析用の画像取得など、さまざまなアッセイ系に対応する。B) Operetta™の外観。ハイコンテンツイメージングを導入されたい方に最適なハイコンテンツイメージ

1つは細胞画像から数値データを抽出する画像解析のテクノロジー、もう1つはそれらの数値データと画像

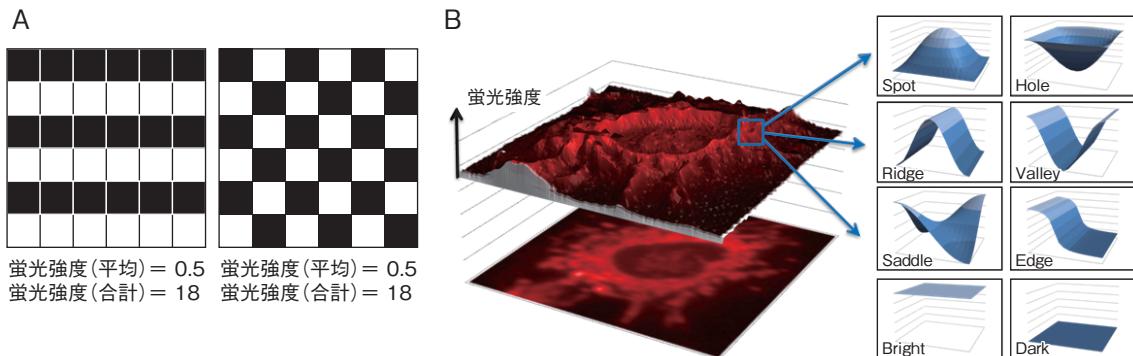


図2 テクスチャ解析

A) 縞模様と市松模様の蛍光強度。白いマスの蛍光強度を1、黒いマスを0とすると、まったく違う画像でも、同じ蛍光強度をもつ画像として定量化される。B) PerkinElmer社のテクスチャ解析で使えるパラメータの模式図(青色)。テクスチャ解析では、ある1つのピクセルと、その周辺のピクセルの相対的な蛍光強度が、SpotやEdge、Saddleなどのパラメータに、どの程度フィットするかを数値化する。このため、単純な蛍光強度の平均や合計では算出できない画像の質感を定量化できることになる

データを紐付けし、必要なときに必要なデータだけを抜き出せる画像マネジメントのテクノロジーである。

従来の画像解析とその限界

これまでの画像解析は、定量解析したい部位、いわゆるROI (Region Of Interest)とよばれる領域を自ら設定し、その形状や蛍光強度を計測するのが一般的だった。例えば、GFPタグのついたタンパク質が強制発現している細胞の、細胞あたりのタンパク質の発現量を知りたい場合には、それぞれの細胞に対してマニュアルでROIを設定し、定量を行う。この従来の方法の欠点として、目で見て対象を切り分けるために、主観が入ってしまう可能性を否定できない点と、大量のデータを処理するには適さない点があげられる。

その一方で、蛍光強度だけをもとにした画像解析には限界があることも知られている。たとえば、図2Aで示した2つの模様、縞と市松模様を比べてみたい。この2つの模様は、明らかに違うと目で見てわかる。しかし、それぞれのマスをピクセルとし、白いマスを蛍光強度1、黒を0と考え画像解析を行ってみると、2つの模様の合計蛍光強度も平均の蛍光強度も、全く同じ値になってしまふ。このように、目で見た印象と算出された解析結果である数値が奇妙にずれてしまう現象も、従来の画像解析の限界と考えられる。

これからの画像解析

そこで、次世代の細胞生物学に貢献するものとして、ROIを自動で正確に設定する良質なアルゴリズムをもつ画像解析ソフトウェアがあげられる。さらに、蛍光強度のみをもとにした既存の画像解析に加えて、先に例にあげた縞と市松模様のような蛍光強度は同じでも異なるパターンを区別できる新しい画像解析テクノロジーがあげられる。

PerkinElmer社が開発した画像解析ソフトウェアAcapella™は、ROIの自動認識に加え、パターンを認識できる新しい手法のテクスチャ解析(Texture Analysis)を備えている。ここでのTextureとは、「質感」という意味をもっている。この解析法を利用することで、縞模様や市松模様のようなパターンの区別の他に、ざらざらしている、なめらかである、という質感の違いも数値として表現できるようになる(図2B)。この解析法の興味深いところは、目で見ても認識できない細かな質感までを定量化しうることである。読者の方々も、顕微鏡を覗き、細胞の様子を見るだけで、一見同じに見えるにもかかわらず、細胞のコンディションや分化の進行度が直観的に区別できるようになった経験はないだろうか。このようなうまく言葉にできない細胞の様子を、テクスチャ解析は質感を定量することにより、数値として落とし込むポテンシャルも秘めている解析法と考えられる。

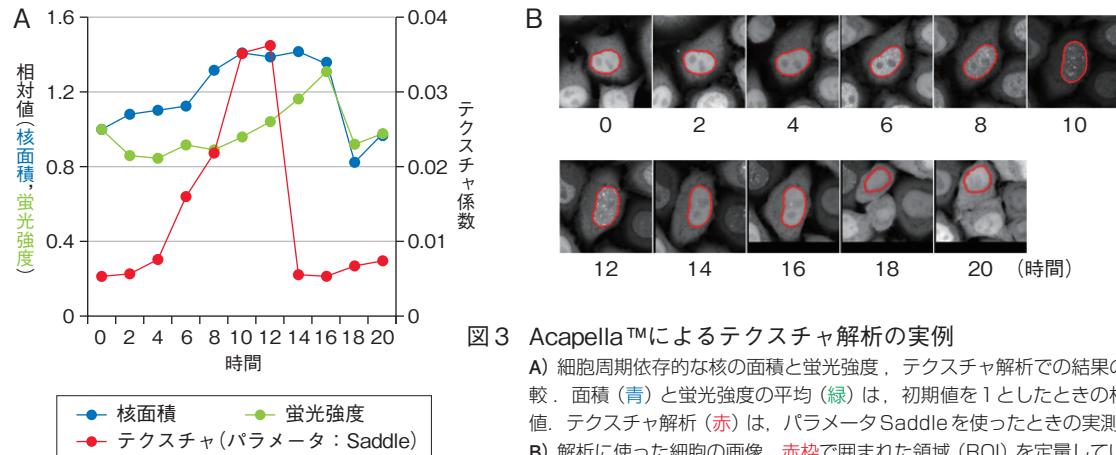


図3 Acapella™によるテクスチャ解析の実例

A) 細胞周期依存的な核の面積と蛍光強度、テクスチャ解析での結果の比較。面積(青)と蛍光強度の平均(緑)は、初期値を1としたときの相対値。テクスチャ解析(赤)は、パラメータ Saddle を使ったときの実測値。B) 解析に使った細胞の画像。赤枠で囲まれた領域(ROI)を定量している

テクスチャ解析： 細胞周期解析への応用例

このテクスチャ解析を実際の研究に応用した例を図3で取り上げてみる。1つの細胞の核の経時的变化を追い、それぞれのタイムポイントごとに、面積と蛍光強度の定量、そしてテクスチャ解析を行っている。イメージ中、赤く囲まれている部分が核(ROI)であり、それぞれのタイムポイントで定量される領域となる。

核の面積の変化は、最大時と最小时で約1.6倍であった(図3A●)。蛍光強度を定量すると、約1.3倍の差が見られた(図3A●)。しかし、イメージをよく見ると、細胞周期の進行に伴って核内の蛍光強度の分布が変わり、顆粒状のものの出現と消失も見られるが(図3B)、既存の蛍光強度の定量では、検出することができない。ところが、Acapella™によるテクスチャ解析では、その変化を7倍の差として定量化することができた(図3A●)。テクスチャ解析は新しい手法のため、まだ応用例は多くないが、既存の蛍光強度だけでは十分な数値変化が見られなかった実験に適用することで、新たな知見を生み出す可能性がある。

画像マネジメント

① 画像データ管理が直面する問題

先に述べたように、大量の画像データが簡単に生み出せるようになると、そこから有意なものを抜き出す画像解析テクノロジーとともに、データマネジメントという考えが不可欠になる。特にOpera™やOperetta™

のように短時間で大量の細胞イメージを撮影可能な次世代システムの場合は、画像解析と一体となった画像マネジメントが重要となる。有用なイメージデータを簡単に取り出す必要があるからだ。

これまでの画像データ管理というと、個人がハードドライブを持ち歩く方法が主流だった。この方法ではデータの共有が難しいことが問題となる。チームワークがその進歩に加速度を与える現代科学では、簡単にデータを共有できるシステムをもつことは必須である。

また、せっかく共有したとしても、イメージング装置間でファイル形式が異なるため、簡単に比較ができないという問題もある。たとえば、A社製顕微鏡で撮った細胞イメージは、B社製顕微鏡のソフトウェアで閲覧することができない。さらにもう1つの問題は、膨大なファイルから必要なファイルを見つける方法である。どこにどのファイルがあるかは、ハードドライブの所有者しかわからないことが多く、卒業や異動でその所有者がいなくなると、せっかく撮り溜めた画像は、永遠に眠りについてしまうことが多い。知的財産を有效地に活用するためにも、画像マネジメントは必要不可欠なものだろう。

② “イメージングサーバ” というソリューション

これらの問題を解決するには、画像マネジメントサーバを導入するのが1つの方法である。PerkinElmer社が提供しているColumbus™イメージングサーバは、イメージデータの保存、閲覧、検索から、ユーザー管理までの一元化を可能にした(図4)。サーバをネット

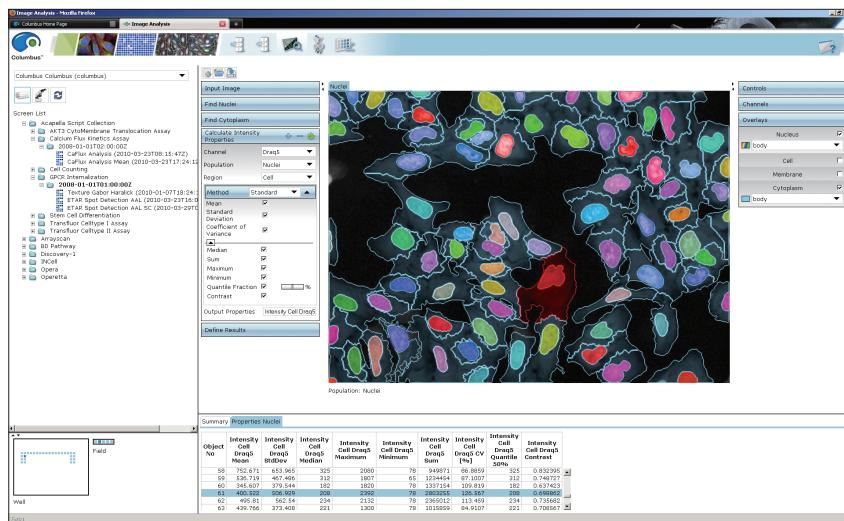


図4 イメージングサーバ Columbus™のインターフェイス

画面左側にサーバ内の画像のリスト。画面中央では、細胞の画像解析を行っている。画面下部には、解析結果が数値として表示されている。このように、画像マネジメントと画像解析が一体化することによって、より効率的なイメージデータの運用が可能になる

ワーク上に置き、各種イメージからの画像データをネットワーク経由でそのままインポートすれば、画像の検索や閲覧が1つのソフトウェア (Columbus™専用プラウザ) 上でできるようになる。対応している画像形式は幅広く、Leica, Nikon, Olympus, Zeiss各社をはじめとする顕微鏡で撮影したイメージをメタデータごとのインポートや、GE Healthcare社のIN Cell AnalyzerやThermo Fisher Scientific社のArrayScanのようなハイコンテンツイメージ装置で撮影したプレート形式のイメージ、さらに、CTやMRIなどで得られたDICOM画像や組織切片などのイメージもインポートできる。一度インポートしたイメージは、もとの形式に関係なくColumbus™上で開けるため、複数のイメージソフトウェアを開く手間が省けると同時に画像の比較も簡単になる。加えてColumbus™には、前述のテクスチャ解析を含めた画像解析機能が付随しているので、画像解析を1つのソフトウェアで行えるという利点もある。さらに画像解析と画像マネジメントが一体化することで、画像解析結果を利用した検索が可能になり、利便性がより高くなる。「核が10個以上あるイメージ」のようなクライテリアが利用できるため、より直観的な検索を可能にするからだ。

まとめ

細胞解析の基礎となる顕微鏡は、近年飛躍的に発展した。それにより、次世代細胞解析の方向性の1つとして、イメージングの自動化により大量のデータを読み出し、網羅的な解析を行えるような環境が整いつつある。この大量のデータを効率よくハンドリングするためには、テクスチャ解析のような新しい画像解析と画像マネジメントを組合わせることが必要になる。PerkinElmer社は、Acapella™やColumbus™の提供を通じて、最新の解析技術とマネジメントのソリューション、ひいては、次世代の細胞解析のインフラストラクチャーの構築に寄与していきたい。



株式会社 パーキンエルマージャパン
バイオディスカバリー事業部

〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町134
横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4階
TEL : 045-339-5862 FAX : 045-339-5872
<http://www.perkinelmer.co.jp>



- 超軽量プッシュボタン



- スプリング式ノーズコーン:
 - 人間工学に最適化
 - チップに完璧に密着



- エルゴノミクスデザイン:
 - Eppendorf
 - PhysioCare concept



NEW!

Raise the limits

エッペンドルフ リサーチプラスシリーズ

エッペンドルフから、次世代のスタンダードピペットが新登場。
超軽量ピペット「リサーチプラス」は、使いやすさを追求し
つつ高い正確性と再現性を達成しました。

● エルゴノミクス

頑丈でありながら超軽量を実現。
ピッティングにかかる力をさらに軽減。
スプリング式ノーズコーンシステム採用。

● フレキシビリティ

溶液に応じて、簡単に容量調整ができます。
本体は丸ごとオートクレーブ可能です。
ユーザーニーズに合わせて様々な容量モデルをご用意。

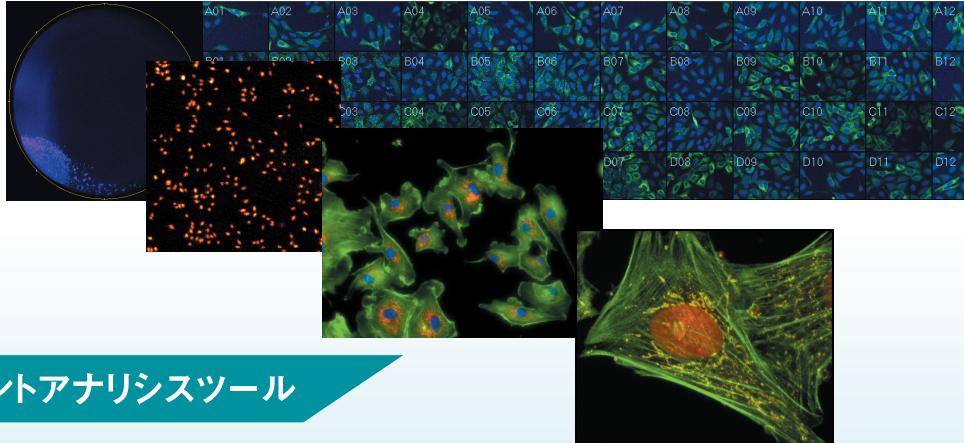
● 耐久性
様々な環境下における厳しい品質チェックを実施。
耐薬性、温度安定性、機械的ストレス耐性は比類の無いものです。

For more information visit:

www.eppendorf.com/research-plus

eppendorf
Japan

エッペンドルフ株式会社 101-0031 東京都千代田区東神田 2-4-5
HP : www.eppendorf.com/jp E-mail : info@eppendorf.jp Tel : 03-5825-2361 Fax : 03-5825-2365



先進のハイコンテンツアナリシスツール

ImageXpress™

ImageXpressTM ULTRA

ハイスループットイメージスクリーニングに対応した自動化共焦点レーザースキャンシステムです。4固体レーザーと4PMTを搭載して同時に4波長のイメージ取得可能です。4倍から100倍までの対物レンズを利用できます。

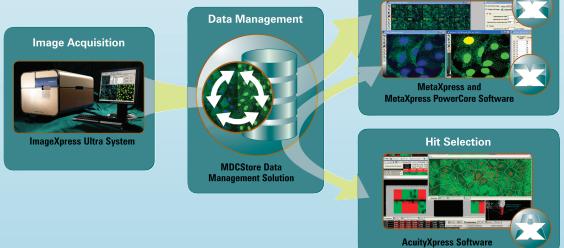
ImageXpressは、高度に自動化されたデジタルイメージングシステムです。細胞の形態変化、あるいはタンパク質の細胞内局在や移動といった細胞レベル、細胞内レベルのマルチパラメータでのデータ取得とイメージデータからの数値解析を行うスクリーニングシステムです。



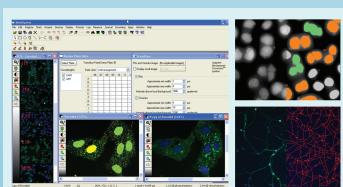
ImageXpressTM MICRO

独自設計の広視野型イメージスクリーニングシステムです。1倍から100倍の対物レンズを利用でき、キセノンランプ光源から多様な蛍光色素に対応します。

Image Screening Total Solution



MetaXpress™ソフトウェアによる高度な解析



MetaXpressは、業界先進のMetaMorph™をベースに構築され、オートメーション化されたImageXpressULTRATMシステムにデザインされています。画像取得から解析を簡単な操作で実行します。

ポビュラーな実験に対応したApplication Moduleは画像解析をより容易におこないます。また、強力な簡易解析マクロを標準搭載し、高度な解析にも対応します。

解析データを可視化するAcuityXpress™ソフトウェア



AcuityXpressは、MetaXpressとシームレスに統合された細胞インフォマティクスソフトウェアです。

MetaXpressの解析データから多パラメータプロファイル、反応曲線、2D散布図や3D主成分分析など様々な分析が可能です。すべての表示形式でオリジナル画像とインタラクティブにリンクしています。

AcuityXpressは、有用なサンプルの発見を容易にします。

ハイスピードイメージング

IsoCyte™ 高速レーザースキャンシステム

独自設計のレーザースキャナーで、高速でプレート全体をスキャンします。細胞やコロニー、ビーズアッセイなどパーティクルを認識し蛍光輝度値を出力します。

6~1536ウェルに対応し、ウェル数に係わらず1プレート5分でスキャンと解析を完了できます。





退色が少ない新世代の蛍光標識ナノ粒子

NEO-STEM / NEO-LIVE

シリカ (SiO_2) の殻（シェル）中に蛍光色素を封入した新世代の蛍光ナノ粒子です。
シリカに封入されているため、蛍光退色しにくくなっています。

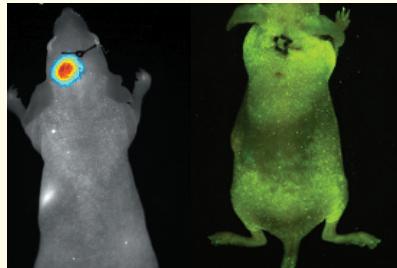
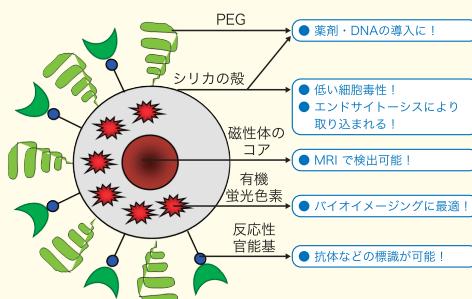
NEO-STEM

- *in vitro* 用で、幹細胞研究に有用です。
蛍光色素に FITC および RITC を用いています。

NEO-LIVE

- 実験動物の *in vivo* イメージングに有用です。
励起および蛍光が近赤外波長のため、組織への透過性が高くなっています。

NEO-STEM / NEO-LIVE の構造



NEO-LIVE Magnoxide 797 (左) および GFP (右) で標識した細胞をマウス脳に導入した。
GFP ではマウスの自家蛍光の影響で鮮明な画像が得られなかったが、NEO-LIVE では鮮明な画像が得られた。

従来品との比較

	量子ドット	細胞分離用 磁気粒子	DiO	PKH26	NEO-STEM, NEO-LIVE
粒径	10 ~ 20 nm	50 nm	—	—	50 nm
機能	蛍光	磁力	蛍光	蛍光	蛍光 + 磁力
蛍光色	赤、緑、青など	—	緑	赤	赤、緑、近赤外
細胞毒性	遊離 Cd による毒性	<i>in vivo</i> 導入不可	細胞膜 浸透性を 攪乱する 場合がある	代謝毒性、 光毒性を示す 場合がある (高濃度時)	毒性を ほとんど 示さない
細胞内 滞在時間	約 3 日	—	7 日	1 週間～数か月	数週間
細胞内局在	細胞質内	細胞膜上	細胞膜上	細胞膜上	細胞質内

■日本総代理店

フナコシ株式会社

〒113-0033 東京都文京区本郷2丁目9番7号

■試薬に関して / Tel.03-5684-1620 Fax 03-5684-1775 e-mail:reagent@funakoshi.co.jp

■受託に関して / Tel.03-5684-1645 Fax 03-5684-6539 e-mail:jutaku@funakoshi.co.jp

■機器に関して / Tel.03-5684-1619 Fax 03-5684-5643 e-mail:kiki@funakoshi.co.jp

動物細胞受託培養サービスを始めました。

GMP対応のハイグレードなクリーンルームを用い、ユーザー様からお預かりした細胞を培養し、細胞中の状態を記録致します。
必要に応じてmRNA抽出・cDNA合成、培地上清・細胞回収、細胞数計数、蛍光観察等、およびリアルタイム培養細胞観察システムによるモニタリングも行い、ハイレベルなデータを提供致します。



▲弊社細胞科学研究所での作業風景



器材を壁に埋め込み気流の障害をできるだけ無くしました

バイオクリーンルーム

- クラス100が可能
- 清浄区域とメンテナンスルームの隔離
- 乱流のないスムーズなエアの流れ

リアルタイム培養細胞観察システム



明視野観察
(オレンジLED)

蛍光観察
(青色LED)
(緑色LED)

電動XY
ステージ

Z軸用
ステッピング
モーター

多検体観察
(マルチポイント)
が可能に!

(蛍光2波長のタイムラプス)

■実績ある自社開発80LエアージャケットCO₂インキュベーターとの融合により更に安定した観察・撮影環境を作り上げました。

■CCMソフトウェアにマルチポイント観察のための機能がアップグレードされました。

■Z軸自動撮影機能により指定したスライス面での撮影が0.5μmステップで可能です。

筋芽細胞(対物10×)



インスリンを含む培地中での褐色脂肪細胞(対物20X)



詳細は下記にお問い合わせください

 株式会社アステック



本社 :〒811-2207 福岡県粕屋郡志免町南里4丁目6番15号
TEL:(092)935-5585(代) FAX:(092)936-6613

東京営業所 TEL:(03)3834-4485(代) FAX:(03)3834-4626
福岡営業所 TEL:(092)935-5685(代) FAX:(092)935-5581

大阪営業所 TEL:(06)6838-3108(代) FAX:(06)6305-4616
札幌営業所 TEL:(011)780-4485(代) FAX:(011)780-4488



MILLIPORE



NEW!

セルカウント これからは Scepter

本体 高精度の測定・解析機能を、ピペットサイズに凝縮

- 計数方式には電気的検知帯法（コールター法）を採用
- 測定結果を72検体まで記憶可能
- 測定結果をパソコンにダウンロード可能
- 専用解析ソフトウェアをご用意
- 本体電源は充電式（パソコンからUSBで充電）

チップ サンプル吸入量と細胞容積を精密に計測

- 専用サンプリングチップ（非滅菌・ディスポーザブル）
- アバチャ一径 : 60μm
- 吸入サンプル量 : 50μL
- 測定可能細胞数 : 10,000~500,000個/mL
- 有効測定範囲 : 8~25μm

製品名	カタログ番号	入数	価格(円)
Scepter Handheld Cell Counter	PHCC00000	1set	420,000
Scepter Tips 60um. 50/pk	PHCC60050	50 tips	22,000

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER®
Research. Development. Production.



www.millipore.com/jpscepter

日本ミリポア株式会社 〒108-6023 東京都港区港南2-15-1 品川インターナシティ A棟 23階 TEL.0120-633-358 FAX.03-5460-0688
ライフサイエンス事業本部 製品についてのお問い合わせは <http://www.millipore.com/jptechservice> ☎ 0120-633-358

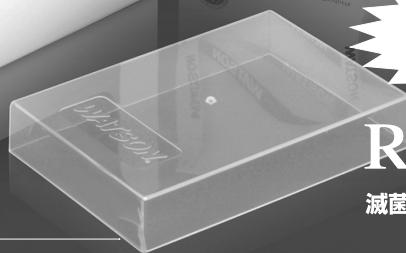
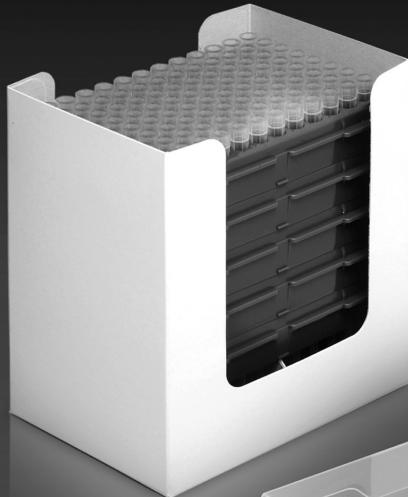
MILLIPOREおよびADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHERはMillipore Corporationの登録商標です。 "M" logo は Millipore Corporationの商標です。
価格には消費税は含まれておりません。

new

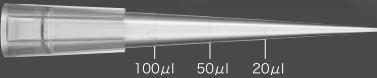
WATSON®

ECOPACK

200μl ピペットチップ 交換用
エコパック



目盛付 実物大 50mm



100μl 50μl 20μl

Sterilized!
滅菌

Ready to use

滅菌済みなのでオートクレーブ不要
詰め替えたたらすぐ使える!

★エコロジー&エコノミー!

★紙製パッケージで廃棄物削減!

★省スペース&省コスト!

発売記念

今ならもれなく
空ラック10個が付いています。
(9月30日まで)



ポリカーボネート製の
頑丈なラックです。



品番	品名	入数	価格(単価)
123R-755YS	エコパック 200μl 滅菌	96本×5段×10パック	15,000円(3.1円)

<http://www.watson.co.jp/product/> ワトソン株式会社 東日本営業所 TEL 03-5840-5471 FAX 03-5840-5472
西日本営業所 TEL 078-991-4489 FAX 078-991-4491