

EZSPHERE®を用いたスフェロイド形成とサイズの測定

EZSPHERE®各ウエルサイズで作製したスフェロイドを横河電機 CellVoyager CV7000にて測定

■細胞種: HeLa細胞 (Azami-green発現)

■培養容器: EZSPHERE®35mmDishバラエティパック (品種コード4000-9VP)

4000-9V	スフェロイドウエル		
	口径 (μm)	深さ (μm)	ウエル数 (個)
4000-901	約200	約100	約9,200
4000-900 (標準タイプ)	約500	約100	約2,300
4000-902	約500	約200	約2,300
4000-903	約800	約400	約1,000
4000-904	約800	約300	約600
4000-905	約1,400	約600	約200

■培養方法: 細胞数 5×10^5 cells/Dishにて、細胞を播種し、7日間培養。
スフェロイドを回収して固定後、96wellプレートに播種。

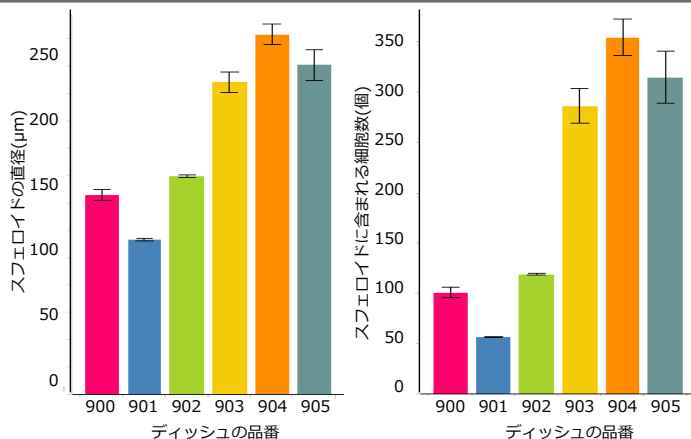
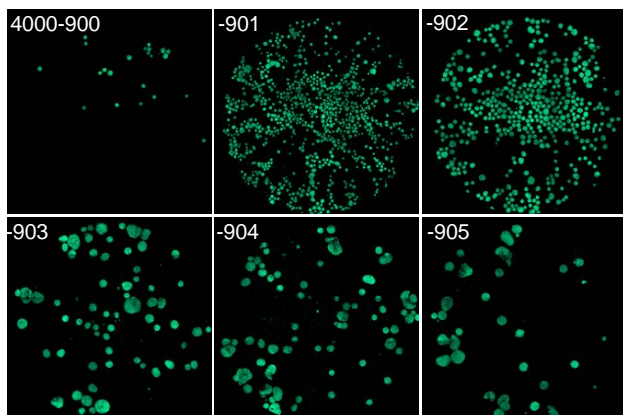
■測定: CellVoyager CV7000にて下記条件で画像取得。解析ソフトを用いて、MIP画像よりスフェロイドの最大直径とそこに含まれる細胞数を数値化、Spotfire®にてグラフを作成。

- ・倍率: 10倍Dry
- ・波長: 488nm
- ・露光時間: 250msec
- ・Z軸方向: 110μmを10μm間隔にて12枚撮影
- ・1平面あたりの取得画像数: 25枚
(Tile機能を使用してウエル全体を撮影
1ウエル当たりの撮影所要時間 約1分半)

※MIP画像とは
画像の3次元表示法。
最大値投影法。
maximum intensity projectionの略。

<結果>

微細wellの径や深さが異なる6種類のEZSPHERE®ディッシュを用いて作製したスフェロイドを横河電機 CellVoyager CV7000で、撮影・解析したところ、微細ウエル径に応じてスフェロイドの大きさが異なる様子が確認できた。また、スフェロイドの最大直径と含まれる細胞数について、微細ウエルの径や深さから予測されるスフェロイドの大きさに関連したデータが得られた。スフェロイドのような3次元サンプルに対しても、効率よく評価を行うことができた。

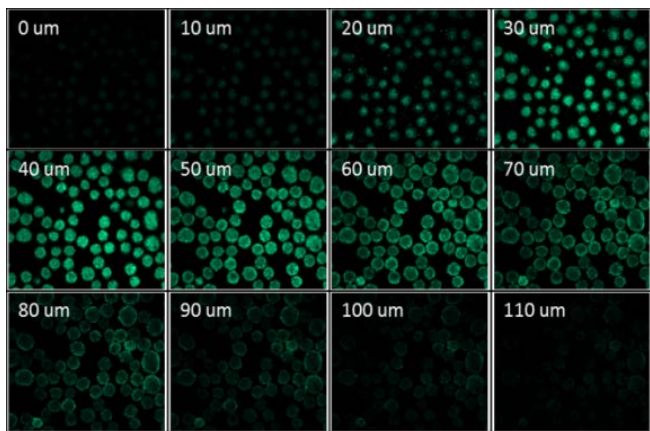


横河電機 CellVoyager CV7000

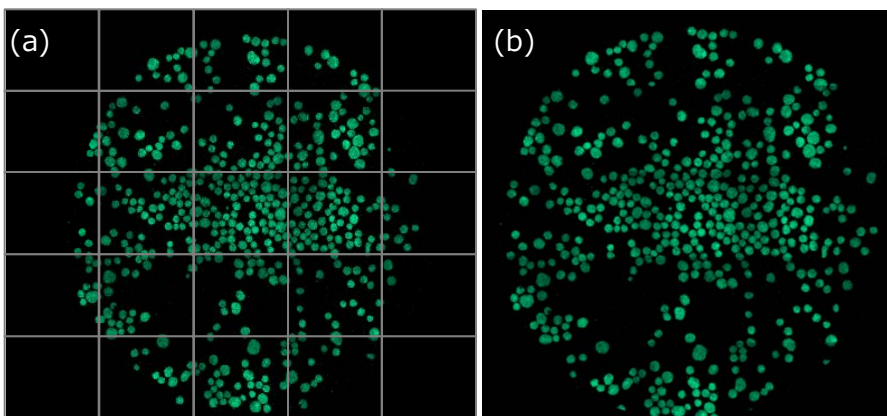
スフェロイド形成された細胞は、単層に培養された2次元組織体に比べ、より生体に近い構造と機能を持つことが確認されています。そのため、様々なスフェロイドの作成手法の開発・データの蓄積が進んでいます。

そこで、CellVoyager CV7000を用いてスフェロイドの撮像・解析が出来るか試みました。具体的には、Z軸方向に複数枚取得した画像を2次元の画像データに再構成^{*}し、スフェロイドの最大直径や含まれる細胞数による評価を行いました。このように、CV7000の高速な3D撮像とProjection機能を組み合わせることで、3次元のサンプルでも効率よく解析することができ、さらに、ライブセルに応用することで、時系列での評価など新しい実験系の確立も可能です。

^{*}Maximum Intensity Projection (MIP) にて再構成

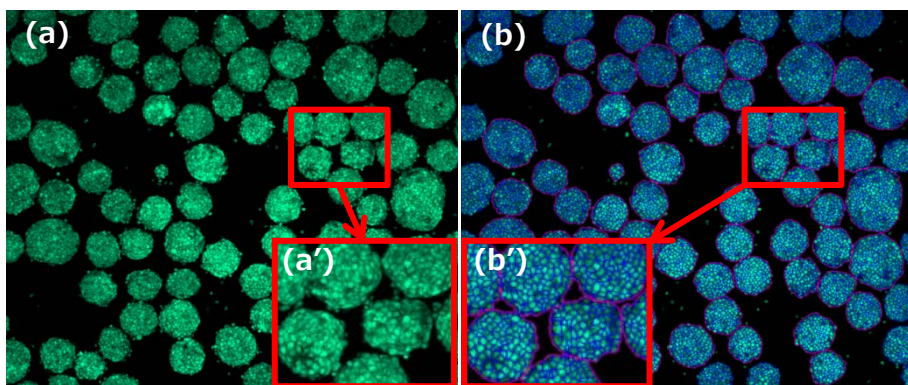


(1) Z軸方向に10μmごとの各スライスの画像



(2) Tile画像

- (a) XY方向に50pixelのオーバーラップを含ませてウェル全体を撮影したTile画像 (25枚)
- (b) (a) のTile画像をオーバーラップ部分を元につなぎあわせて1枚とした画像



(3) 原画像と認識画像

- (a) 原画像
Z軸方向に10μm間隔で12枚撮影し、MIP表示したもの
(a')は一部拡大した画像
- (b) 認識画像
解析ソフトを使用して(a)の画像について、スフェロイドの輪郭(紫)と含まれる細胞(青)を認識した画像 (b')は一部拡大した画像

Spotfire[®]はTIBCO Software Inc. の登録商標です。
CellVoyager は横河電機株式会社の登録商標です。

AGCテクノグラス株式会社

コンシューマ本部 サイテック <http://www.atgc.cp.jp/div/rika>

無断転載禁止